

**Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik  
des Klinikums Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Reichart**

**Untersuchung von Veränderungen der Mikrozirkulation in  
mit Humanblut perfundierten Schweinherzen durch eine  
hyperakute Abstoßungsreaktion, sowie deren  
Beeinflussung durch den humanen Komplementregulator  
hDAF, den GPIIb/ IIIa- Inhibitor Tirofiban und das lösliche  
 $\alpha$ Gal-Oligosaccharid GAS 914 mittels fluoreszierender  
Mikrosphären**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der medizinischen Fakultät der  
Ludwig- Maximilians- Universität München**

**vorgelegt von  
Matthias Erhardt  
aus Heidelberg  
2009**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bruno Reichart**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Armin J. Reininger**

**Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. Erwin Strobel**

**Priv. Doz. Dr. Christian Graeb**

**Mitbetreuung durch**

**den promovierten**

**Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Ulrike Brandl- Selvåg**

**Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR**

**Tag der mündlichen Prüfung: 19.3.2009**

**Meiner lieben Frau Carolin  
und meinen Eltern gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Abkürzungen</b>	10
<b>1. Einleitung</b>	12
1.1 <b>Geschichte der Transplantationsmedizin</b>	12
1.2 <b>Mechanismen der Abstoßungsreaktion nach Xenotransplantation</b>	16
1.2.1 Antikörper und Komplementsystem	16
1.2.2 Gerinnungsaktivierung	19
1.2.3 Histopathologie	20
1.3 <b>Wege zur Überwindung der xenogenen Abstoßungsreaktion</b>	22
1.3.1 Therapien zur Reduktion der präformierten Antikörper	22
1.3.2 Therapien zur Inaktivierung der Komplementkaskade	23
1.3.3 Therapien zur Kontrolle der Gerinnungsaktivierung	25
1.4 <b>Darstellung der Myokardialen Blutflussverteilung mit fluoreszierenden Mikrosphären</b>	27
1.5 <b>Fragestellung der vorliegenden Arbeit</b>	28
<b>2. Material und Methoden</b>	29
2.1. <b>Versuchsgruppen</b>	29
2.2 <b>Anästhesie</b>	31

	<b>Seite</b>
<b>2.3 Herzexplantation</b>	<b>33</b>
<b>2.4 Ex-vivo Perfusionsanlage</b>	<b>36</b>
2.4.1 Funktionsprinzip	36
2.4.2 Messung des Blutflusses	38
2.4.3 Druckmessung	38
2.4.4 Temperaturmessung	38
<b>2.5 Perfusat</b>	<b>38</b>
2.5.1 Gewinnung von humanem Spenderblut	38
2.5.2 Physiologische Sollwerte	39
2.5.3 Medikamente	39
<b>2.6 Versuchsablauf</b>	<b>41</b>
<b>2.7 Untersuchungen der Mikrozirkulation</b>	<b>42</b>
2.7.1 Untersuchungsprinzip	42
2.7.2 Applikation der fluoreszierenden Mikrosphären	43
2.7.3 Dissektionsschema	44
2.7.4 Probenaufbereitung	45
2.7.5 Darstellung der Ergebnisse	46
<b>2.8 Makrozirkulation</b>	<b>47</b>
2.8.1 Koronarfluss	47
2.8.2 Koronarwiderstand	47
2.8.3 Cardiac output	47
2.8.4 arterieller Druck	47
2.8.5 venöser Druck	47
2.8.6 arterio- venöse Sauerstoffdifferenz	48

	<b>Seite</b>
2.8.7	Schlagarbeitsindex 48
2.9	Laboruntersuchungen 48
2.9.1	Gerinnungsparameter 49
2.9.2	Herzenzyme 49
2.9.3	Complement 49
<b>2.10</b>	<b>Antikörper 49</b>
2.10.1	Anti Gal $\alpha$ (1-3)- Gal 49
2.10.2	Anti- Schwein- hämolytische Antikörper 50
<b>2.11</b>	<b>Herzgewicht 51</b>
<b>2.12</b>	<b>Perfusionsdauer 52</b>
<b>2.13</b>	<b>Statistik 52</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse 53</b>
<b>3.a</b>	<b>Beeinflussung der HAR durch hDAF und Tirofiban 54</b>
3.a.1	Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung im gesamten linken Ventrikel 54
3.a.2	Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der Landrasseherzen 55
3.a.3	Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF-transgenen Herzen 56
3.a.4	Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF-transgenen Herzen mit Tirofiban 57
3.a.5	Makrozirkulation 59
3.a.5.1	Koronarfluss 59
3.a.5.2	Koronarwiderstand 60

	<b>Seite</b>
3.a.5.3 Herzzeitvolumen	61
3.a.6 arterio- venöse Sauerstoffdifferenz	62
3.a.7 Schlagarbeitsindex	63
3.a.8 Laboruntersuchungen	63
3.a.8.1 Gerinnungsparameter	63
3.a.8.1.1 Fibrinogen	64
3.a.8.1.2 Antithrombin III	65
3.a.8.1.3 Protein C	66
3.a.8.1.4 Thrombozytenverbrauch	67
3.a.8.2 Creatininphosphokinase	67
3.a.9 Herzgewicht	68
3.a.10 Perfusionsdauer	69
<b>3.b Beeinflussung der HAR durch GAS 914</b>	<b>71</b>
3.b.1 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung im gesamten linken Ventrikel	72
3.b.2 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF-transgenen Herzen	73
3.b.3 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF-transgenen Herzen mit GAS 914	74
3.b.4 Arterio- venöse Sauerstoffdifferenz	76
3.b.5 Schlagarbeitsindex	77
3.b.6 Laboruntersuchungen	78
3.b.6.1 Gerinnungsparameter	78
3.b.6.1.1 Fibrinogen	78
3.b.6.1.2 Thrombozytenverbrauch	79

		Seite
3.b.7	Herzenzyme	80
3.b.7.1	Creatininphosphokinase	80
3.b.7.2	Creatininphosphokinase MB	81
3.b.7.3	Glutamat- Oxalacetat- Transaminase	82
3.b.7.4	Lactatdehydrogenase	83
3.b.8	Komplement	84
3.b.8.1	C3	84
3.b.8.2	C4	85
3.b.9	Antikörper	87
3.b.9.1	Anti Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgG	87
3.b.9.2	Immunglobuline G gesamt	88
3.b.9.3	Anti Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgM	89
3.b.9.4	Immunglobuline M gesamt	90
3.b.9.5	Anti- Schwein- hämolytische Antikörper	91
3.b.10	Herzgewicht	92
3.b.11	Perfusionsdauer	93
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	94
<b>4.1</b>	<b>Methodik/ Pathophysiologie</b>	94
<b>4.2</b>	<b>Beinflussung der hyperakuten Abstoßungsreaktion durch hDAF unter Berücksichtigung der Makro- und Mikrozirkulation</b>	96



	<b>Seite</b>
<b>4.3</b>	<b>Beinflussung der hyperakuten Abstoßungsreaktion durch hDAF und Tirofiban unter Berücksichtigung der Makro- und Mikrozirkulation</b>
	106
<b>4.4</b>	<b>Beinflussung der hyperakuten Abstoßungsreaktion durch hDAF und GAS 914 unter Berücksichtigung der Makro- und Mikrozirkulation</b>
	109
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>
	115
<b>6.</b>	<b>Vorträge und Publikationen</b>
	118
<b>6.1</b>	<b>Originalpublikationen</b>
	118
<b>6.2</b>	<b>Abstracts</b>
	120
<b>6.3</b>	<b>Vorträge</b>
	124
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>
	125
<b>8.</b>	<b>Curriculum Vitae</b>
	159
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>
	160

## Abkürzungen

ACxR	akute zelluläre xenogene Abstoßung
ADP	Adenosin Diphosphat
AHxR	akute humorale xenogene Abstoßung
AUC	Area Under the Curve
AVDO <sub>2</sub>	Arteriovenöse Sauerstoffdifferenz
AVR	akut vaskuläre Abstoßung
CD 59	Membranhinhibitor der reaktiven Lyse (MIRL)
°C	Grad Celsius
CK	Creatininphosphokinase
CO	cardiac output
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
diast.	diastolisch
EER	Endo-/ Epi Ratio
fMS	fluoreszierende Mikrosphären
Gal	Galaktose
GOT	Glutamat- Oxalacetat- Transaminase
HAR	Hyperakute Abstoßungsreaktion
hDAF	human Decay Accelerating Factor
HF	Herzfrequenz
I.E.	Internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IU	international Units
kB	Kilobasen
KG	Körpergewicht
LAP	Linker atrieller Druck
LDH	Laktatdehydrogenase
MAP	mittlerer arterieller Druck
MCP	Membrane- Cofactor- Protein
per Inf.	per Infusionem
PERV	porcines endogenes Retrovirus
PNAK	präformierte natürliche Antikörper
PTCA	perkutane transluminale Koronarangiographie
SAI	Schlagarbeitsindex
sCR-1	soluble Complement Receptor Type 1
SPU	Sample Processing Unit
syst	systolisch
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
V.	Vena
VAD	Ventricular Assist Device
V.C.I:	Vena cava inferior
V.C.S	Vena cava superior
Vv.	Venae

# 1. Einleitung

## Geschichte der Xenotransplantation

Seit der ersten von Christian Barnard durchgeführten klinischen Herztransplantation im Jahre 1967 (Barnard 1967) ist durch den enormen Fortschritt in der immunsuppressiven Therapie wie auch durch die stetige Verbesserung der Operationstechnik und postoperativen Versorgung die klinische Herztransplantation zu einem routinemäßig durchgeführten Eingriff geworden.

Die Medizin begann sich bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts mit der Transplantation von Organen zu befassen. Alexis Carrell entwickelte 1902 (Carrell 1902) verschiedene chirurgische Techniken, um Blutgefäße zu anastomosieren und ermöglichte damit die Transplantation vaskularisierter Organe. Zunächst waren verschiedene Transplantationen innerhalb einer Spezies (Allotransplantation) und zwischen verschiedenen Spezies (Xenotransplantation) wenig erfolgreich. Erst später wurden dann die immunologischen Mechanismen der Transplantatabstoßung zunehmend verstanden (Gibson 1943). Ab 1954 standen Steroide zur immunsuppressiven Therapie zur Verfügung. Hinzu kamen 1958 Methotrexat und 1963 Azathioprin, welches bei Nierentransplantationen erstmals klinische Anwendung fand (Starzl 1963).

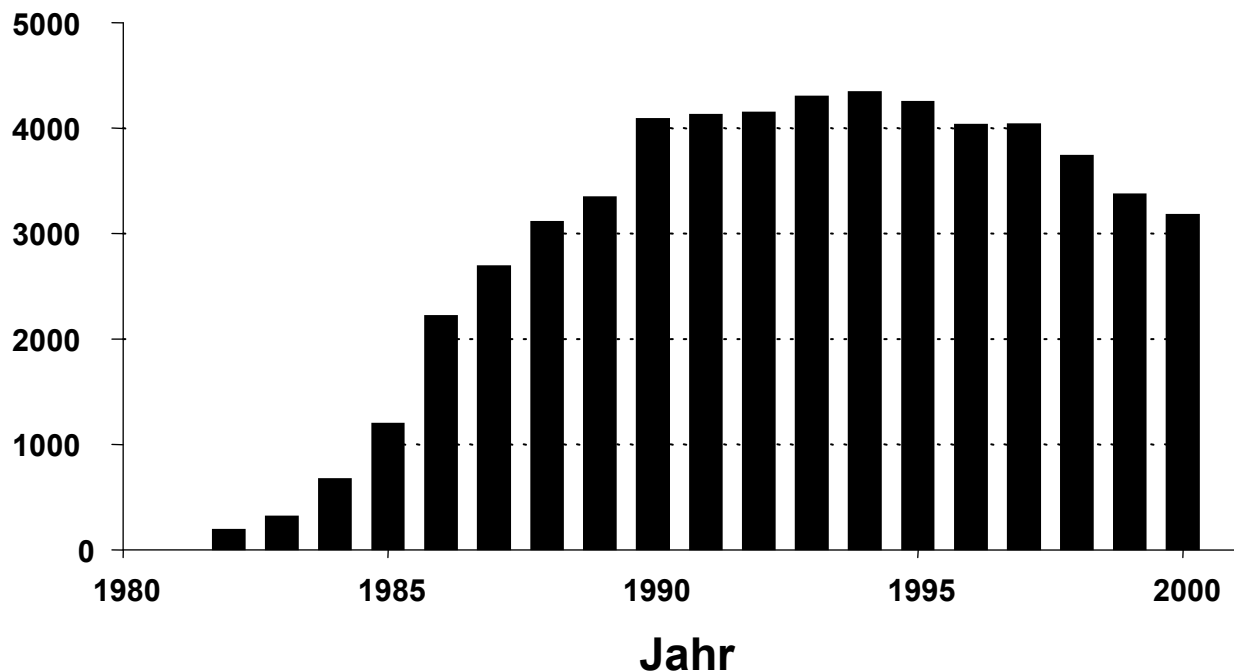
Eine entscheidende Verbesserung der immunsuppressiven Therapie erbrachte der klinische Einsatz von Ciclosporin A, welches seit 1983 in Deutschland zugelassen ist.

Seit der Mitte der 80er Jahre nahm die Anzahl der weltweit durchgeführten Herztransplantationen stetig zu (ISHLT Statistik 1980-2000). Seit einem Maximum von über 4000 durchgeführten Herztransplantationen Mitte der 90er Jahre geht die Anzahl wieder zurück. Nur ein Teil der auf der Warteliste stehenden Patienten konnte ein passendes Spenderherz erhalten. Im letzten Jahrzehnt hat sich die Zeit, die

Patienten auf ein Organ warten müssen, weiter verlängert, während dagegen die Sterblichkeit auf der Warteliste sinkt. Die geringere Sterblichkeit ist allerdings wahrscheinlich auf bessere Algorithmen bei der Zuteilung der Organe zurückzuführen (Pierson 2004). Bei pädiatrischen Patienten ist der Organmangel noch eklatanter und die Mortalität dieser Patientengruppe ist im Vergleich zu den Erwachsenen höher (Magee 2005).

In der Xenotransplantation könnte eine Möglichkeit bestehen, diesen Organmangel zu beheben.

Die erste klinische xenogene Herztransplantation wurde 1964 von Hardy ohne relevantes Transplantatüberleben durchgeführt (Hardy 1964). Nach verschiedenen Versuchen einer klinischen Herzxenotransplantation konnte 1964 erstmals ein Überleben von vier Tagen erreicht werden (Barnard 1977). Starzl transplantierte 1993 einem Patienten mit einer chronischen Hepatitis B, eine Pavianleber unter anderem mit der Absicht, eine Reinfektion der Leber mit dem humanen HBV zu verhindern. Eine Pilzinfektion führte jedoch zu einer Sepsis und so wurde nur ein Überleben von 70 Tagen erreicht. Die letzte klinische Herzxenotransplantation wurde 1992 durchgeführt (Czaplicki 1992). Hierbei wurde ein Schweineherz in einen Menschen transplantiert und ein Überleben von 24 Stunden erreicht. Es existiert jedoch keine histopathologische Auswertung des Organs.



*Abb 1.1: Weltweit durchgeführte Herztransplantationen*

Zunächst stellte sich die Frage, welche Tierspezies sich am besten als Organspender eignet. Organe der mit dem Menschen am nächsten verwandten Spezies der Primaten (konkordante Xenotransplantation) würden nicht hyperakut abgestoßen werden, jedoch kommt eine Nutzung als Organspender aus ethischen Gesichtspunkten nicht in Frage. Zudem stehen Menschenaffen unter Artenschutz. Primaten eignen sich aber auch auf Grund einer langen Tragezeit mit nur einem Nachkommen, einer aufwändigen Züchtung, sowie einer für den Menschen zu geringen Körpergröße nicht als Organspender. Zusätzlich besteht das Risiko der Krankheitsübertragung, insbesondere von Viren vom Primaten auf den Menschen (Allan 1998 a,b,c; Michaels). Die Diskordanz, d.h. der phylogenetisch weite Abstand

aller anderen Spezies zum Menschen, bedingt eine xenoreaktive Abstoßung (Land 1971, Hammer 1973)

Das Schwein hat sich in den letzten Jahren als Organspender zur Xenotransplantation durchgesetzt. Nach kurzer Tragezeit (ca. 114 Tage) werden viele Nachkommen geboren, zudem ist die Zucht günstig und unkompliziert. Die Größe der Herzen und ihre Morphologie stimmen gut mit der des Menschen überein. Genetische Modifikationen der Tiere, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern, lassen sich beim Schwein gut durchführen. Die ethischen Bedenken sind geringer, da Schweine seit Jahrhunderten als Nutztiere domestiziert sind. Es besteht weiterhin bereits heute die Möglichkeit, Schweine spezifisch pathogenfrei (spf) zu züchten.

Auch bei Schweinen besteht die Gefahr der Erregerübertragung, insbesondere von porcinen endogenen Retroviren (PERV). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass eine Übertragung von PERV auf den Menschen unwahrscheinlich ist und es bisher keinen Nachweis einer Infektion bei Patienten nach Kontakt mit porcinen Organen oder Geweben gibt (Simon 2003, Winkler 2005, Moscoso 2005).

Unabhängig von den immunologischen Barrieren der klinischen Xenotransplantation stellt sich die Frage, ob ein Schweineorgan die physiologische Funktion auch im menschlichen Organismus aufrechterhalten kann (Hammer 1998 und 2002). So können porcine Moleküle wie Calcitonin oder Insulin auch beim Menschen eine physiologische Wirkung zeigen, während porcines Komplement, Albumin und Erythropoetin keine Kompatibilität mit dem menschlichen Organismus besitzen (Hammer 1998). Dagegen ist eine physiologische Funktion bei der Xenoherztransplantation zu erwarten, da das Herz hauptsächlich eine mechanische Funktion im Körper übernimmt.

## **1.2 Mechanismen der Abstoßungsreaktion nach**

### **Xenotransplantation**

#### **1.2.1 Antikörper und Komplementsystem**

Transplantiert man ein Schweineorgan in eine phylogenetisch weit entfernte Spezies wie den Mensch, so wird es im Rahmen einer hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) innerhalb von Minuten bis zu einigen Stunden durch zytotoxische Antikörper zerstört (Platt 1991, Bach 1995, Daniels 1997). Der Mechanismus der HAR entspricht einer Typ II Reaktion nach Coombs und Gell und ist einer ABO Inkompatibilität im Rahmen einer Allotransplantation vergleichbar. Die HAR tritt jedoch nicht bei allen Xenotransplantationen auf. Zwischen einigen eng verwandten Spezies wird keine HAR beobachtet (Chaussy 1975, Hammer 1975). Definitionsgemäß werden diese Spezies „konkordant“ genannt, Spezies zwischen denen eine HAR beobachtet wird sind „diskordant“ (Kissmeyer- Nielsen 1966). Bei Menschen und nichthumanen Altweltaffen sind präformierte natürliche Antikörper (PNAK) im Serum nachweisbar (Kissmeyer- Nielsen 1966). Untersuchungen zeigten, dass diese Antikörper nicht schon seit der Geburt vorhanden sind sondern, dass sie sich sehr früh in der Kindheit als Reaktion auf die Besiedlung des Dickdarmes mit Bakterien bilden (Hammer 1998, Michler 1995, Xu 1995). Da bei neugeborenen Pavianen die PNAK noch nicht existieren, werden xenogene Organe von diesen nicht hyperakut antikörpervermittelt abgestoßen (Kaplon 1995).

Histologisch zeigt sich diese durch die Bindung von präformierten zytotoxischen Antikörpern und Bildung von Immunglobulinen mit der Aktivierung des Komplementsystems. Durch die Komplementaktivierung mit Endothelzerstörung kommt es zu interstitiellen Hämorrhagien und Ödemen, welche durch eine Thrombozytenaggregation mit den Zeichen einer venösen Thrombose weiter verstärkt werden (Rose 1996).



Der Großteil aller präformierten, xenoreaktiven Antikörper binden an das Gal $\alpha$ (1-3)Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc-R Epitop auf dem Schweineendothel (Cooper 1993, Sandrin 1993, 1994, Lin 1997). Der Zuckerrest Gal $\alpha$ (1-3)- Gal wird durch das Enzym  $\alpha$ -Galaktosyltransferase gebildet, welches alle Säugetiere mit Ausnahme der Menschen- (Gorilla, Schimpanse, Orang Utan) und nichthumanen Altweltaffen (Pavian, Rhesus, Cynomolgus) besitzen (Galili 1998).

Beim Menschen sind 85 % aller xenoreaktiven Antikörper und bis zu 95 % aller xenoreaktiven IgM Antikörper gegen das Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Epitop gerichtet (Gallili 1993, Platt 1996). Antikörper der Klasse IgG scheinen eine geringere Rolle zu spielen, tragen aber ebenso zu HAR bei (Rieben 2005). In Biopsien von Schweineorganen findet man IgM- Ablagerungen vor allem auf dem Endothel, wobei sich IgG vorwiegend im Interstitium und in Fibrinthromben findet (Platt 1991).

Durch die Bindung dieser PNAK an die xenogene Oberfläche wird das Komplementsystem vorwiegend auf dem klassischen Weg aktiviert (Dalmaso 1992, Baldwin 1992). Die Bindung präformierter zytotoxischer Antikörper auf dem Endothel führt dazu, dass das FC- Fragment des Antikörpers freiliegt. An dieses wird C1q gebunden, welches C1rs aktiviert. Von dieser Esterase werden die Faktoren C2 und C4 aktiviert. Die Zusatzbezeichnungen a und b bezeichnen die durch Proteolyse aus den Komplementfaktoren entstandenen kleineren Proteine, das kleinere erhält die Zusatzbezeichnung „a“ das größere „b“. Der aktivierte Faktor C4b bindet an das Endothel, und C2 bindet kovalent daran. Durch die Aktivierung von C2 durch C1s entsteht die C3 Konvertase C4b2b. Durch die Bildung des Faktors C3b durch die C3 Konvertase wird die C5 Konvertase gebildet (C4b2b3b), welche schließlich C5 aktiviert, das mit C6- C9 den Membranangriffskomplex bildet. Der am Ende der Komplementkaskade gebildete Membranangriffskomplex (MAC) führt zur Zerstörung der Endothelzellen und damit des Transplantats. C3a, C5a und C6a wirken neben

Ihrer Rolle im Komplementsystem auch als Anaphylatoxine. Das Komplementsystem wird beim Menschen durch verschiedene Komplementregulationsfaktoren kontrolliert. Dies sind vor allem human Decay Acceleration Factor (hDAF/ CD 55), Membrane Cofactor Protein (CD 46/ MCP), Membraninhibitor der reaktiven Lyse (MIRL/ CD 59).

Untersuchungen zeigten aber auch, dass das Komplementsystem auf dem alternativen, antikörperunabhängigen Weg, aktiviert wird. Der klassische und der alternative Weg unterscheiden sich in der Bildung von C3b. Im Serum kommt es zu einer kontinuierlichen Hydrolyse von C3 zu C3b. Bindet C3b an Endothel, bindet es den Faktor B und D, und der so entstandene C3bBp Komplex bildet die C3 Konvertase des alternativen Weges. Im xenogenen Modell gelingt eine Kontrolle des alternativen Weges durch die Komplementregulationsfaktoren MCP, hDAF oder Faktor H nicht. Nach Bildung von C3b läuft die Komplementaktivierung in beiden Aktivierungswegen gleich ab.

Wang konnte zeigen, dass es in Herzen von Kaninchen, welche heterotop in Schweine transplantiert wurden, unabhängig davon, ob im Serum der Empfängertiere präformierte zytotoxische Antikörper vorlagen, zu einer Ablagerung von Komplementfaktoren (C3) auf dem Endothel kam. In den immunhistochemischen Untersuchungen ließen sich auf dem Endothel der transplantierten Herzen nur bei gesäugten Schweinen IgG und IgM Antikörper nachweisen, der Komplementfaktor C3 war auch ohne den Nachweis von oben genannten Antikörpern auf dem Endothel gebunden (Wang 1992). Auch in anderen Untersuchungen konnte eine Komplementaktivierung unabhängig von einer antikörpervermittelten Aktivierung auf dem klassischen Weg gezeigt werden. Durch die Elimination von xenoreaktiven Antikörpern aus dem Perfusat bei xenogen mit humanem Blut perfundierten

Kaninchenherzen, konnte eine Aktivierung des Komplementsystems nicht verhindert werden (Forty 1993).

Durch immer besser werdende Behandlungsschemata kann die HAR heute aber über 24 Stunden hinausgezögert werden. Die nach 24 Stunden stattfindende Form der HAR, kann sowohl über PNAK, als auch über induzierte Antikörper, welche sich neben dem Gal $\alpha$ (1-3)-Gal Epitop auch gegen andere Epitope richten, vermittelt werden (Galili 2001, Rose 2002). Nach der HAR findet die akut vaskuläre Abstoßung (AVR) statt. Die AVR wird auch akut- humorale Abstoßung bezeichnet, was den ihr zu Grunde liegenden Mechanismus einer antikörpervermittelten Abstoßung beschreibt. Die AVR ist mit der akut zellulären Abstoßung eng verknüpft. Mediatoren der zellulären Abstoßung sind die natürlichen Killerzellen, T-Zellen und Monozyten. Daneben kommt es zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und einer Gerinnungsaktivierung (Platt 1997, Bach 1996, Candinas 1996, Kwiatkowski 2000). An die akut vaskuläre, bzw. akut zelluläre Form schließt sich die chronisch zelluläre Abstoßung an.

### **1.2.2 Gerinnungsaktivierung**

Neben der Komplementkaskade und deren Aktivierung durch die PNAK ist die Gerinnungsaktivierung ein entscheidender Mechanismus in der xenogenen hyperakuten und akut vaskulären Abstoßungsreaktion. Diese ist charakterisiert durch die Bildung von Fibrin- Thrombozyten- Aggregaten. Die Endothelzerstörung verursacht die Aktivierung von Thrombozyten durch den Kontakt mit der Zellmatrix mit nachgehender Thrombozytenadhäsion und Vasokonstriktion (Platt 1997). Alleine der Kontakt des Empfängerblutes mit der xenogenen Oberfläche kann direkt zur Thrombozytenaktivierung führen.

Dieser Mechanismus ist vergleichbar mit der physiologischen Gerinnungsaktivierung im intrinsischen System (Kemp 1991).

Auch Endothelzellen, welche nicht direkt über das Komplementsystem geschädigt werden, können direkt antikörpervermittelt aktiviert werden. Porcine Endothelzellen werden aber auch direkt über das Komplementsystem aktiviert (Bach 1996, 1997). Diese Veränderungen in der Hämostase bewirken nicht nur thrombotische Gefäßverschlüsse des Organs, sondern können darüber hinaus zu einer systemischen Form der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führen. Diese ist durch eine starke Verminderung der Thrombozytenzahl, einen starken Abfall des Fibrinogens, einen Anstieg der Prothrombinzeit, der D- Dimere, und des Tissue factors gekennzeichnet.

Die thrombotische Vaskulopathie betrifft besonders die kleinen und mittleren Gefäße (Levi 1999). In verschiedenen Xenotransplantationstudien wurden diese Zeichen einer DIC beobachtet (Gaca 2002, Ierino 1998). So wurde wiederholt über verlängerte Prothrombin- und partielle Prothrombinzeit, eine deutliche Thrombozytopenie und eine Blutungsdiathese mit hohen Spiegeln von Thrombin und Fibrinogen, sowie disseminierte Fibrin- und Thrombozytenagglomerate nach Xenotransplantation berichtet (Cozzi 2004). Auch nach der Transfusion von peripheren porcinen Leukozyten zeigen sich die Zeichen einer DIC (Buhler 2000).

### **1.2.3 Histopathologie**

Histopathologisch sind bei abgestoßenen Herzen nach Xenotransplantation Fibrin- und Thrombozytenthromben vor allem epikardial, aber auch intramyokardial nachweisbar. Bei länger überlebenden xenotransplantierten Pavianen finden sich histologisch verschieden alte Infarkte mit Granulationsgewebe um die nekrotischen Myozyten. Immunhistologisch zeigt sich eine Ablagerung von IgM, IgG, Komplementfaktoren wie z. B. C3 sowie von Membranangriffskomplexen (C5b- 9). Die thrombotischen Gefäßverschlüsse sind hauptsächlich epikardial gelegen (Rose 2000) und betreffen am stärksten postkapilläre Venolen. Cattel und Jamieson stellten

bereits 1975 bei der Transplantation von Meerschweinherzen auf Ratten einen endothelialen Zellschaden vor allem in Venolen fest.

Auch in anderen Organen, wie z.B. der Leber zeigt sich vor allem eine Reaktion in den terminalen Venolen (Wight 1991). Rose et al. hatten insgesamt 117 konkordante und diskordante Xeno- und Allograft- Herztransplantationen histologisch auf thrombotische Vorgänge hin untersucht. Venöse Thromben wurden vor allem in den epikardialen Venen beschrieben. Die Autoren postulierten, dass postkapilläre Venolen sehr leicht mit arteriellen Kapillaren zu verwechseln sind und umgekehrt, wodurch in der histopathologischen Untersuchung venöse Thrombosen in diesen Gefäßen oft nicht als venös erkannt werden. Daneben werden Thromben in Venolen oft mit interstitiellen Thromben verwechselt, da man die endotheliale Einkleidung der Thromben oft nur nach immunhistologischer Anfärbung der Endothelzellen erkennt. Die Verschlüsse in überwiegend epikardial gelegenen Venen und Venolen führen dann zu einem Rückstau bis in das Kapillarbett mit interfaszikulärem und interstitiellem Ödem. Die venösen Thrombosen führen anschließend zu einem weiteren Druckanstieg in den proximal davon liegenden Gefäßen, was zu Hämorrhagien führt. Dieser Mechanismus würde auch die unregelmäßige Verteilung von Hämorrhagien und Nekrosen erklären, denn die inhomogene Verteilung der Thromben und Hämorrhagien ist mit einer ubiquitären Endothelschädigung und disseminierten thrombotischen Verschlüssen in allen Gefäßabschnitten nicht zu erklären (Rose 2000). Da die endokardialen Venen am weitesten von den hauptsächlich verschlossenen epikardialen Venen entfernt sind, sind die negativen Auswirkungen im Sinne von Hämorrhagien und interfaszikulären, bzw. interstitiellen Ödemen hier am deutlichsten. Rose et al. beobachteten, dass Hämorrhagien in der äußeren Hälfte des Myokards nicht oder nur sehr viel seltener als endokardial gelegene nachweisbar sind. Arterielle thrombotische Verschlüsse traten nur selten

auf, und dies erst nachdem eine venöse und kapilläre Thrombosierung erfolgt ist (Rose 2000, Goddard 2002).

### **1.3 Wege zu Überwindung der xenogenen Abstoßungsreaktion**

Die hyperakute Abstoßungsreaktion kann durch die Hemmung der Bindung der PNAK gegen das Gal $\alpha$ (1-3)-Gal-Epitop, der Aktivierung des Komplementsystems oder auch der Gerinnung verhindert werden.

#### **1.3.1 Therapien zur Reduktion der präformierten Antikörper**

Eine Technik zur Reduktion der PNAK stellt eine präoperative Xenoorganperfusion des Empfängerblutes in einem anderen Organ dar. Die Reduktion der PNAK erfolgt durch deren Bindung im perfundierten Organ. Als Organ, welches dann nach der Perfusion mit dem Empfängerblut verworfen wird, können z. B. die Nieren oder die Leber eines Schweins verwendet werden (Tuso 1993).

Eine andere Möglichkeit, die HAR zu verringern, stellen extrakorporale Immunabsorptionssäulen dar, welche polyklonale Antikörper gegen humanes IgG, IgA und IgM enthalten. An diese werden die Antikörper gebunden und so kann vor Xenotransplantation der Antikörperspiegel signifikant reduziert werden (Leventhal 1995, Brenner 2000, 2005). Es wurden auch spezifische Säulen gegen das Gal $\alpha$ (1-3)-Gal-Epitop entwickelt, welche nicht mehr den Nachteil herkömmlicher Immunadsorptionssäulen einer Reduktion aller Antikörper mit einer nachfolgend erhöhter Infektanfälligkeit aufweisen (Watts 2000).

Der Nachteil dieser genannten Methoden liegt darin, dass eine dauerhafte Entfernung der PNAK aus dem Serum nicht erreicht werden kann und diese aufwendigen Verfahren der Immunadsorption oder ex-vivo Xenoperfusion aus diesem Grund wiederholt angewendet werden müssten.

Durch die intravenöse Infusion von löslichen Antigenen, die das Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Epitop tragen, können die Antikörper an diese gebunden und somit aus dem Serum des Empfängers entfernt werden. Infundiert man Gal $\alpha$ (1-3)- Melibiose oder Arabinogalaktan in Paviane, wird das Überleben heterotop transplanterter Schweineherzen deutlich verlängert. Die Infusion dieser löslichen Zuckerreste hat jedoch gravierende toxische Nebenwirkungen (Cooper 1992, Ye 1994). Um das optimale infundierbare Oligosaccharid zu finden, wurden verschiedenen Subtypen eines künstlichen, infundierbaren Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Epitops in Bezug auf die Potenz, möglichst viele der Antikörper zu binden, untersucht, und es zeigten sich deutliche Unterschiede in ihrer Wirkung. So hat das freie synthetische Gal $\alpha$ (1-3)- Gal beta1-4 Glc NAc Molekül eine 300 fach größere Effektivität als Melibiose. Das reine Disaccharid Gal $\alpha$ (1-3)- Gal wiederum hat im Vergleich zu Gal $\alpha$ (1-3)- Gal beta1-4GlcNAc eine 10 fach niedrigere Effektivität (Galili 1996). Romano konnte zeigen, dass Di-und Tri-alpha Gal- Sacchariden die Zytotoxizität des Serums um 70 % reduzieren.

GAS 914 ist ein Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Trisaccharid, welches an ein Poly-L-Lysin Grundgerüst gebunden ist. Zhong et al konnten eine signifikante Reduktion der Sterblichkeit durch eine Transplantatabstoßung nach Nieren- Xenotransplantation von hDAF- transgenen Schweinen auf Paviane zeigen. In den Biopsien zeigten sich in der Therapiegruppe deutlich weniger Zeichen einer humoralen Abstoßung als bei den Pavianen, die kein GAS 914 erhielten (Zhong 2003).

### **1.3.2 Therapien zur Inaktivierung der Komplementkaskade**

Durch die Infusion von Inhibitoren des Komplementsystems kann dieses systemisch blockiert werden. Das Schlangengift Cobra Venom Faktor kann das Komplementsystem effektiv blockieren und verlängert das Transplantatüberleben nach Xenotransplantation signifikant (Leventhal 1993). Auch die Gabe von Soluble

Complement Receptor Type 1 (sCR- 1) (Pruitt 1994) oder von gegen das Komplementsystem gerichteten Immunglobulinen (Magee 1995) führen zu einer Verlängerung der Überlebenszeit des Xenotransplantats durch eine Inhibition der Komplementkaskade. Infundierbare Komplementregulatoren blockieren das gesamte Komplementsystem und führen zu starken systemischen Nebenwirkungen. So steigt die Infektionsgefahr stark an, was gerade bei Transplantierten und immunsupprimierten Patienten ein entscheidender Nachteil ist (Kobayashi 1997). Um diesen Nachteil zu überwinden, wurden transgene Schweine produziert, welche humane Komplementregulationsfaktoren auf dem porcinen Gefäßendothel exprimieren.

Durch Mikroinjektionstechnik in Eizellen wurden Schweine produziert, welche für die humanen Komplementregulationsfaktoren hCD 59 und hDAF transgen sind. hCD 59 verhindert die Bindung von C9 an C8 und blockiert die Bildung des MAC (Fodor 1994). hDAF konkurriert mit C2 um die Bindungsstelle an C4 und verhindert somit die Bildung der C3 Konvertase sowohl des klassischen, als auch des alternativen Weges (Cozzi 1995). hDAF wirkt früher in der Komplementkaskade durch die Verhinderung der Bildung der C3 Konvertase als hCD 59, das erst am Endpunkt in der Bildung des Membranangriffskomplexes wirkt. Dadurch wird durch hCD59 nicht die Bildung proinflammatorischer Komplementfaktoren wie C3a oder C4a und C5a verhindert (Byrne 1997, McCurry 1995). In der Arbeitsgruppe von Schmoeckel et al. wurden hDAF transgene Schweineherzen ex- vivo perfundiert und heterotop und orthotop in Paviane transplantiert. Das Transplantatüberleben konnte signifikant verlängert werden, und es zeigten sich keine Zeichen einer frühen komplementvermittelten HAR (Schmoeckel 1996, 1997, Bhatti 1999).



### 1.3.3 Therapien zur Kontrolle der Gerinnungsaktivierung

Die Inhibition der prokoagulatorischen Serinprotease Thrombin, die Fibrinogen in Fibrin umwandelt, verbesserte ex- vivo die Funktion der Herzen und deren Überlebenszeit. Histopathologisch zeigen sich weniger intravaskuläre Fibrinthromben, Ödeme und Hämorrhagien, weniger Thrombozytenaggregate und eine geringere Leukozytenextravasation (Robson 1996). Im Vergleich zu Heparin zeigte die Thrombininhibition mit Hirudin signifikante Vorteile im ex- vivo Modell in Bezug auf das Überleben und die histopathologischen Veränderungen (Uchita 2001). Alwayn et al. verglichen die Funktion von verschiedenen Thrombozytenaggregationshemmern (TAH) und stellten fest, dass im Xenotransplantationsmodell deutliche Unterschiede in der Wirkung bestehen. Hierzu wurden Schweineherzen heterotop auf Paviane transplantiert und die Effektivität der Thrombozytenaggregationshemmer überprüft. Es wurden ein von Willebrand- Faktor Antagonist (ATA), ein Selectin- Inhibitor (Fucoidin), welcher P- Selectin auf Thrombozyten blockiert, ein Glykoprotein IIb/ IIIa Antagonist (Eptifibatid), ein Thromboxan- Synthese- Inhibitor, der die durch Thromboxan hervorgerufene Vasokonstriktion und Thrombozytenaggregation verhindert (1- Benzylimidazol), Prostacyclin- 2, das ebenfalls neben der Hemmung Thrombozytenaggregation auch eine vasodilatatorische Wirkung zeigt, sowie Heparin und Nitroprussid- Natrium verglichen. 1- Benzylimidazol und Prostacyclin- 2 zeigten eine moderate Thrombozyteaggregationshemmung ohne Nebenwirkungen. ATA und Fucoidin bewirkten zwar eine starke Thrombozytenaggregationshemmung führten, aber zu starken Blutungskomplikationen. Nitroprussid- Natrium zeigte eine im Xenotransplantationsmodell zu schwache Thrombozytenaggregationshemmung. Die besten Ergebnisse als potente TAH mit wenig Nebenwirkungen zeigten Heparin und der GpIIb/ IIIa Antagonist Eptifibatid (Alwayn 2000).

Auch von anderen Autoren wird beschrieben, dass die Gabe von GpIIb/IIIa Antagonisten eine Reduktion der Mikrothromben, der Fibrinablagerungen, der Hämorrhagien und der Leukozyteninfiltration bewirkt und das Transplantatüberleben verlängert (Candinas 1996). Schirmer und Byrne stellten hingegen keinen Einfluß der TAH mit Aspirin und Clopidogrel bzw. Warfarin und Heparin auf die HAR nach Herz-Xenotransplantation fest, halten aber eine positive Beeinflussung für möglich (Schirmer 2004, Byrne 2005).

GpIIb/IIIa Antagonisten wirken, indem sie an den Rezeptor GpIIb/ IIIa auf Thrombozyten binden, an dem normalerweise Fibrin bindet und somit die Thrombozytenaggregation vermittelt. Der GpIIb/ IIIa Rezeptor ändert nach Stimulation z. B. mit Thrombin oder ADP seine räumliche Anordnung und wird dadurch aktiviert (Sims 1991).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Tirofiban selbst keine inflammatorische Wirkung entwickelt; dies ist besonders in einem Transplantationsmodell wichtig. Bei Patienten, die einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) unterzogen und mit Tirofiban behandelt wurden, zeigte sich keine Erhöhung der Inflammationsmarker IL- 1, IL- 6, TNF alpha oder CRP (Bonz 2003, Akbulut 2004). Die Frage, ob Tirofiban die Thrombozytenaktivierung insgesamt beeinflusst und somit auch einen positiven Effekt auf die Bildung von Aggregaten von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten hat, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Bei Patienten, die an eine extrakorporale Zirkulation eines Ventricular assist devices (VAD) angeschlossen waren, um die linksventrikuläre Funktion zu unterstützen, konnte die Aktivierung der Leukozyten und Thrombozyten, die sich durch erhöhte Spiegel von Zytokinen wie Leukotrien C4 oder Platelet factor 4 und der neutrophilen Elastase bemerkbar macht, durch die Gabe von Tirofiban signifikant verringert werden (King 2001). Ito beschreibt eine

starke Verringerung von P- Selektin auf den Thrombozyten nach der Gabe des GpIIb/ IIIa Antagonisten Cilostazol, die aber nach Gabe von Tirofiban geringer ausfällt (Ito 2004). Bertram konnte eine Verringerung der Thrombozyten- Leukozyten Interaktion bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom nachweisen (Bertram 2002). Andere Autoren sehen keinen Effekt auf die Thrombozyten- Leukozyten Interaktion (Caron 2002).

#### **1.4 Darstellung der myokardialen Blutflussverteilung mit fluoreszierenden**

##### **Mikrosphären**

Die Veränderungen der Myokardperfusion bei xenogener hyperakuter Abstoßung wurden bisher lediglich indirekt durch histologische, bzw. histochemische Untersuchungen beschrieben. Eine Darstellung der Blutflussverteilung wie z.B. durch radioaktive, bzw. fluoreszierende Mikrosphären im Xenotransplantationsmodell ist bisher nicht erfolgt.

Die Idee, den Blutfluß mittels injizierbarer Partikel, welche im im Kapillarbett des Gewebes aufgehalten werden, zu messen, entstand bereits am Anfang des letzten Jahrhunderts. 1909 wurde von Pohlmann eine Methode beschrieben, den regionalen myokardialen Blutfluss mittels Stärkepartikeln zu bestimmen. Andere Methoden waren die Applikation von Pollenkörnern (Gregg 1935) oder Glasmikrosphären (Prinzmetall 1947). Später wurden radioaktive Mikrosphären appliziert, welche jedoch durch die Radioaktivität bedingt, einen hohen logistischen, bzw. technischen Aufwand bei der sicheren Anwendung erfordern. Fluoreszierende Mikrosphären stellen eine etablierte Methode dar, um die Durchblutung des Herzens sehr exakt und sicher zu verschiedenen Zeitpunkten und mit hoher räumlicher Auflösung darzustellen. Es werden sehr kleine fluoreszierende Partikel, welche sich im Kapillarbett verfangen, in den linken Vorhof injiziert, um dann deren Verteilung im Myokard entsprechend der Durchblutung zu messen. Durch die Applikation

verschiedener Farben können auch verschiedene Zeitpunkte untersucht werden (Thein 2002, Chien 1995, Kowallik 1991, Hale 1988). Um die Veränderungen der Mikrosphärenverteilung im Myokard räumlich darzustellen, wurden die Herzen in genau definierte Segmente unterteilt, in denen die Mikrosphärenkonzentration gemessen wird. Um die transmuralen Unterschiede der Mikrozirkulation im Myokard darzustellen, kann der Quotient aus den Mikrosphärenkonzentrationen der endokardialen und epikardialen Segmente (Endo-/ Epi- Ratio) gebildet werden (Bussemaker 1997, Li 1996). Mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären kann z.B. in ischämischen Herzen nach Verlegung einer Koronararterie nachgewiesen werden, dass die endokardiale Durchblutung bei koronarer Ischämie im Vergleich zur subepikardialen Durchblutung stärker abnimmt, was zu einem Abfall der Endo-/ Epi- Ratio führt. Li konnte mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären zeigen, dass das Verhältnis von endokardialer zu epikardialer Durchblutung (Endo-/ Epi- Ratio) bei koronar bedingter Ischämie von ursprünglich 1,04 auf 0,47 bei Ischämie abfällt (Li 1996).

### **1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Ein Ziel dieser Arbeit ist die erstmalige Darstellung der morphologischen, physiologischen und laborchemischen Veränderungen während der hyperakuten Abstoßungsreaktion xenogen mit Humanblut perfundierter Schweineherzen im Zusammenhang mit der Darstellung der korrespondierenden Veränderungen der Myokardperfusion mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellt die Darstellung und Überprüfung von Therapieoptionen bezüglich der Aktivierung Komplementsystems, der Gerinnung und der Reduktion der präformierten natürlichen Antikörper dar.

Um die Veränderungen bei hyperakut abgestoßenen Herzen und darzustellen, wurden in dieser Arbeit Herzen von Landrasseschweinen, hDAF- transgene

Schweineherzen ohne weitere Therapie und hDAF- transgene Schweineherzen, die unter der Zugabe des Thrombozytenaggregationshemmers Tirofiban oder des löslichen Glykoproteins GAS 914 zur Bindung der PNAK mit Humanblut perfundiert wurden, verglichen. Als Versuchsmodell wurde das von Forty et al. entwickelte (Forty 1993) und am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwigs- Maximilians Universität München weiterentwickelte ex- vivo Perfusionsmodell gewählt. Dieses ermöglicht es, mit hoher Reproduzierbarkeit und mit im Vergleich zu orthotopen oder heterotopen xenogenen Herztransplantationen günstigeren Kosten und geringerem personellen und zeitlichen Aufwand, xenogene Perfusionsversuche durchzuführen (Suckfüll 1994, Schmoeckel 1996). Die Versuche waren Teil des von der Bayerischen Forschungstiftung geförderten Forschungsprojektes: „Produktion multitransgener Schweine und Entwicklung immunmodulatorischer Strategien für die klinische Xenotransplantation“. Die Ergebnisse dieser ex- vivo Perfusionsversuche flossen auch in die am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwigs- Maximilians Universität durchgeführten orthotopen Herztransplantationen im Schwein- auf- Primat Modell ein.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsgruppen**

Es wurden vier Versuchsgruppen mit jeweils sechs Tieren untersucht: Die Kontrollgruppe (Gruppe A) bestand aus deutschen Landrasseschweinen<sup>1</sup>. Die drei Therapiegruppen bestanden aus für den humanen Komplement- Regulationsfaktor human Decay Acceleration Factor (hDAF) transgenen Schweinen<sup>2</sup> (Gruppe B, C, D), einer Kreuzung aus den Rassen large white und Landrasse. Die Transgenität der

---

<sup>1</sup> Lehr und Versuchstieranstalt, LMU München, D- Oberschleißheim

<sup>2</sup> Fa Harlan Italy SrL, I- Correzzana (Milano )

Schweine war mit Hilfe von Mikroinjektion eines Minigen- Konstrukts erreicht worden. Dieses Gen ist 6,5 kB lang, wobei es 4,5 kB genomische DNA enthält. Diese beinhaltet die nicht abgelesene 5' Sequenz, die Signalpeptidsequenz des hDAF-Gens, sowie das erste Exon und Intron des Gens. Dieses Genfragment ist mit einem cDNA- Fragment verbunden, das die restlichen Exons des Gens sowie 41 Adenosinbasen enthält, die das poly- Adenosin- Ende der m RNA bilden. Die Expression wurde vor jedem Versuch immunhistochemisch kontrolliert.

Die erste Therapiegruppe der hDAF- transgenen Herzen erhielt keine weitere Therapie (Gruppe B). Eine Thrombozytenaggregation sollte in der zweiten hDAF- Gruppe (Gruppe C) durch Tirofiban, einen GP IIb/ IIIa Antagonisten verhindert werden. Zusätzlich zur hDAF- Transgenität wurde in der dritten Therapiegruppe (Gruppe D) GAS 914<sup>3</sup>, ein infundierbares Oligosaccharid, welches dem Gal $\alpha$ (1,3)- Gal Epitop auf dem Schweineendothel entspricht, in das Perfusat gegeben. Hierdurch sollten die gegen das Gal $\alpha$ (1,3)- Gal Epitop gerichteten präformierten natürlichen Antikörper gebunden werden.

<b><u>Versuchsgruppe</u></b>	<b><u>Gruppe A</u></b>	<b><u>Gruppe B</u></b>	<b><u>Gruppe C</u></b>	<b><u>Gruppe D</u></b>
	<b>Kontrolle</b>	<b>Therapiegruppe I</b>	<b>Therapiegruppe II</b>	<b>Therapiegruppe III</b>
<b><u>Versuchstiere</u></b>	Dt. Landrasse	hDAF- transgen large/ white	hDAF- transgen large/ white	<i>hDAF- transgen large/ white</i>
<b><u>Medikamentöse Therapie</u></b>	<i>keine</i>	<i>keine</i>	<i>Tirofiban</i>	<i>GAS 914</i>

Abb 2.1: Versuchsgruppen

<sup>3</sup> GAS 914<sup>®</sup>, Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz

Die Tiere erhielten bis zum Operationstag keine Medikation. 12 Stunden vor Versuchsbeginn fand keine Nahrungsaufnahme mehr statt.

Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 8,4 kg waren die Tiere am Versuchstag im Mittel 4-6 Wochen alt.

## **2.2 Anästhesie**

Die Prämedikation erfolgte intramuskulär in den Nacken des Tieres. Bereits im Tierstall wurde am sedierten Tier ein venöser Dauerkatheter über eine oberflächliche Vene am Ohr gelegt. Über diesen Zugang erfolgte die Einleitung und die Aufrechterhaltung der Narkose bis zum Anlegen eines zentralen Katheters<sup>4</sup> über die V. femoralis in der Leiste.

### **Prämedikation:**

Azaperon<sup>5</sup> (10mg/ kg KG i.m.)

Ketaminhydrochlorid<sup>6</sup> ( 10mg/ kg KG i.m.)

Atropinsulfat<sup>7</sup> ( 0,007 mg/ kg KG i.m.)

### **Narkoseeinleitung:**

Midazolam<sup>8</sup> (10mg i.v.)

Fentanyl (1,5 mg i.v.)

Pancuroniumbromid<sup>9</sup> (0,1 mg/ kg KG)

### **Narkoseerhaltung:**

Disoprivan<sup>10</sup> 2% 4 ml/h per inf.

---

<sup>4</sup> Leader Cath<sup>®</sup>: Fa. Vygon, Frankreich- Ecoven

<sup>5</sup> Stresnil<sup>®</sup>: Fa. Janssen- Cilag GmbH, D- Neuß

<sup>6</sup> Ketavet<sup>®</sup>: Fa. Pharmacia& Upjohn GmbH, D- Erlangen

<sup>7</sup> Atropinsulfat<sup>®</sup>: Fa. B. Braun AG, D- Melsungen

<sup>8</sup> Midazolam- Ratiopharm<sup>®</sup>: Fa: Ratiopharm GmbH, D-Ulm

<sup>9</sup> Pancuronium- Curamed<sup>®</sup>: Fa. Curamed Pharma GmbH, D- Karlsruhe

<sup>10</sup> Recofol<sup>®</sup>: Fa. Curamed Pharma GmbH, D- Karlsruhe

Nach Wirkungseintritt der Prämedikation wurde das Versuchstier unter Sauerstoffgabe über eine Beatmungsmaske in den OP gebracht und die Narkose eingeleitet. Es wurde dann in Rückenlage mit überstrecktem Hals auf dem OP Tisch mit Mullbinden fixiert und endotracheal intubiert<sup>11</sup>. Die Beatmung erfolgte mit einem Sauerstoff- Druckluft- Gemisch<sup>12</sup>. Die Beatmungsfrequenz betrug 20/ min und das Atemvolumen 2,5- 3,5 l/ min. Der Beatmungsdruck betrug maximal 30 mmHg. Diese Einstellungen wurden anhand von regelmäßigen Blutgasuntersuchungen kontrolliert, bzw. den Messwerten angepasst.

---

<sup>11</sup>Tracheal Tube 4,5mm: Fa. Mallinckrodt, Irland- Athlone

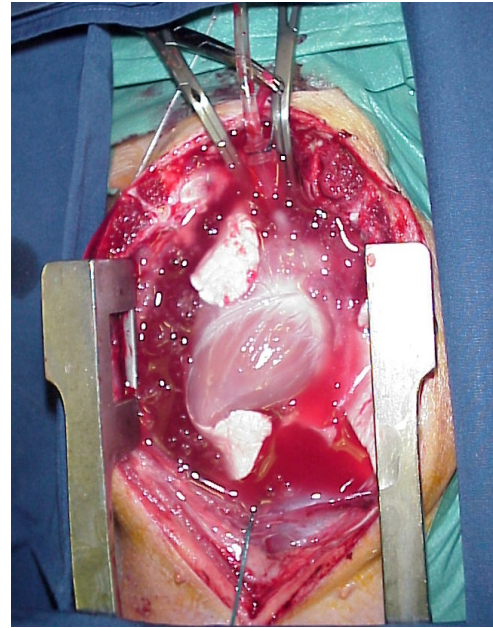
<sup>12</sup> Dräger Servo Ventilator 900B: Drägerwerk AG, D- Lübeck



## 2.3 Herzexplantation

### Präparation des Operationssitus

Der Hautschnitt erfolgte von der Incisura jugularis bis unterhalb des Processus xyphoideus. Nach medianer Durchtrennung des Musculus pectoralis erfolgte die mediane Sternotomie. Der Thorax wurde mit einem Thoraxspreizer offen gehalten und anschließend der Herzbeutel längs eröffnet. Die teilweise Entfernung von Thymusgewebe ermöglichte eine gute Übersicht über das OP-Feld. Die Vena cava inferior (V.C.I.) wurde doppelt angeschlungen. Um ein sicheres



*Abb 2.2: Herz vor Explantation*

Klemmen der Aorta zu gewährleisten, wurden Aorta und der Truncus pulmonalis vorsichtig getrennt. Nun wurde eine Tabaksbeutelnaht in die Aorta ascendens circa einen Zentimeter distal der Aortenklappe angelegt und mit einem Turniquet gesichert. Im Zentrum dieser Naht wurde nun die Aorta mit einer Aortenwurzelkanüle<sup>13</sup> punktiert. Durch Zuziehen und Klemmen des Turniquet konnte die Kanüle gesichert werden. Zusätzlich wurden die Aortenwurzelkanüle und der Turniquet mit einer Fadenligatur verbunden. Nach dem Entlüften der Aortenwurzelkanüle wurde diese dann an die Cardioplegielösung<sup>14</sup> angeschlossen. Noch vor der Aortenpunktion wurde das Versuchstier mit 500 I.E./ kg KG über die proximale Vena cava superior (V.C.S.) vollheparinisiert<sup>15</sup>.

<sup>13</sup> DLP®, Aortic root canula: Fa. Medtronic, Inc., USA- Minneapolis

<sup>14</sup> Custodiol, HTK- Lösung nach Brettschneider®: Fa. Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, D- Alsbach-Hähnlein

<sup>15</sup> Heparin- Natrium®: Fa. B. Braun AG, D- Melsungen

## **Organkonservierung**

Das Ligieren der V.C.I. durch Fadenligatur, sowie das Klemmen der V.C.S. mittels einer 120°- Gefäßklemme unterbrach den venösen Zufluss zum Schweineherzen. Ebenfalls mit einer 120°- Gefäßklemme wurde die Aorta distal der Aortenwurzelkanüle geklemmt. Unmittelbar danach erfolgte die antegrade Perfusion des Schweineherzen über die Coronararterien mit 4° Celsius kalter Cardioplegielösung. Die Dosierung betrug 50ml pro Kilogramm Körpergewicht. Der Perfusionsdruck lag bei 150 mmHg. Während der cardioplegen Perfusion wurde das Herz permanent mit 4° Celsius kalter Ringerscher Spüllösung<sup>16</sup> topisch gekühlt. Durch Inzision von einer Lungenvene, sowie der V.C.I. wurde der Abfluß der Cardioplegielösung erreicht und eine Drucküberlastung des Herzen verhindert. Eine schnelle und homogene Entfärbung des Herzen diente als Beweis für eine erfolgreiche Organperfusion.

## **Herzpräparation**

Nachdem die Cardioplegielösung durch das Organ geflossen war, konnte das Herz entnommen werden. Die Entnahme erfolgte als Herz- Lungen Paket „en bloc“. Nach Durchtrennung der V.C.I. wurden die beiden Lungen in der Thoraxhöhle mobilisiert. Nach Durchtrennung von V. azygos und V. hemiazygos konnte das Herz bis zum Gefäßstamm vom hinteren Mediastinum gelöst werden. Es folgte die Durchtrennung von V.C.S., Aorta ascendens und Truncus pulmonalis mindestens zwei Zentimeter distal von ihrem Abgang vom Herzen. Schließlich erfolgte die Absetzung der Trachea, und das Herz konnte entnommen werden. Die Trennung von Herz und Lunge wurde durch Ligatur aller venösen wie auch arteriellen Gefäße mit anschließender Durchtrennung in sicherem Abstand zum linken Vorhof erreicht. Die beiden Vv. cavae wurden mit Fäden ligiert. Um das Herz an das Perfusionsystem

---

<sup>16</sup> Ringer- Spüllösung®: Fa. Delta Pharma, D- Pfullingen

anschließen zu können, bedurfte es speziell hergestellter Kanülen<sup>17</sup>. Diese waren Kunststoffröhrchen aus Delrin<sup>18</sup>, welche dem Außendurchmesser, dem Schlauchinnendurchmesser des Perfusionsystems, bzw. dem Innendurchmesser von Aorta und Truncus pulmonalis entsprachen. Je nach Größe der Gefäße standen Kanülen mit einem Außendurchmesser von 9, 12, 15 und 18 Millimeter zur Verfügung. Der Innendurchmesser betrug immer 6 Millimeter, die Länge immer 43 Millimeter. Die Kanülen hatten drei eingefräste Querrillen. Sie wurden in Aorta ascendens und Truncus pulmonalis eingebracht und jeweils mit Ligaturen über den Querrillen fixiert, um ein Herausrutschen der Kanülen zu verhindern. Die Kanüle für den linken Vorhof (Innendurchmesser 6 mm, Außendurchmesser 9 mm, Länge 38 mm) wurde in ein zuvor mittels Stichinzision eingebrachtes circa 8 mm umfassendes Loch im linken Herzhohr eingebracht und ebenfalls mit Ligaturen befestigt.

Die Perfusion wurde  $61 \text{ min} \pm 24 \text{ min}$  nach dem Klemmen der Aorta im Spendertier bis zur Freigabe der Perfusion (kalte Ischämie) begonnen.

---

<sup>17</sup> Institut für Chirurgische Forschung, D- München

<sup>18</sup> Delrin®: Fa Salberg

## 2.4 Ex vivo Perfusionsanlage

### 2.4.1 Funktionsprinzip

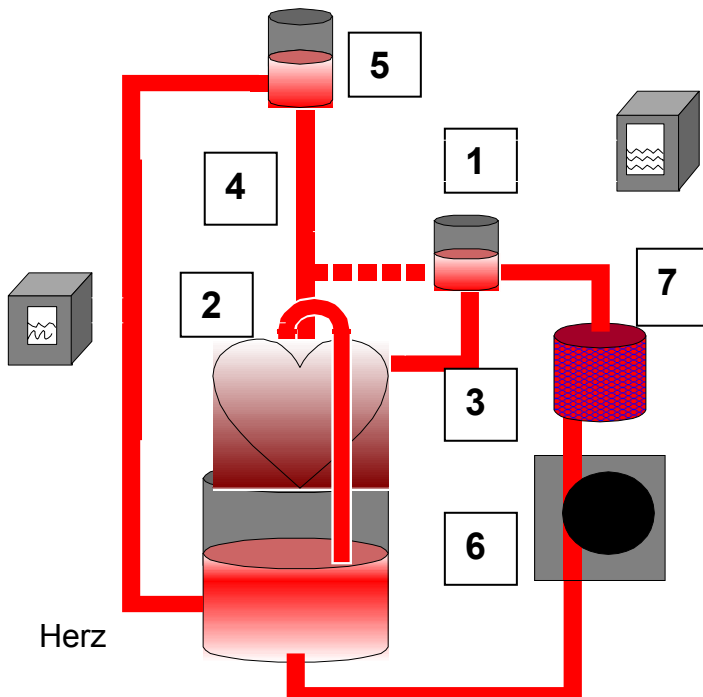


Abb. 2.3: Schematische Darstellung

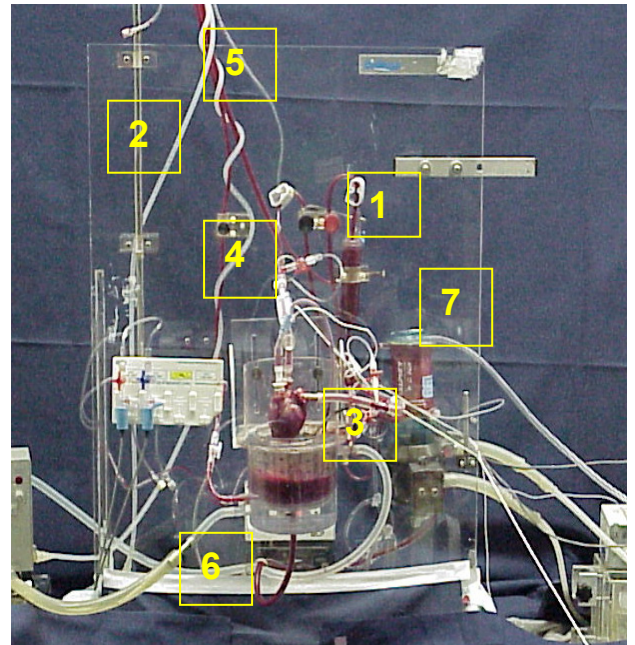


Abb. 2.4: Foto des Perfusionssystems

1: Vorlast    2: Herz    3: Zufluss linker Vorhof (working heart)    4: Zufluss Aorta (Langendorff)    5: Nachlast    6: Rollerpumpe    7: Oxigenator

Das im working- heart- Modus arbeitende Herz warf das Perfusat über die Aorta in ein 75 Zentimeter, entsprechend einer Nachlast von 55 mmHg, über ihm befindliches Nachlastreservoir aus. Von hier gelangte das Perfusat der Schwerkraft folgend in ein direkt unter dem Herz befindliches Reservoir. Eine Rollerpumpe pumpte das Perfusat dann über einen Oxigenator<sup>19</sup> in ein Vorlastreservoir, welches 15 cm, entsprechend einer Vorlast von 11 mmHg, über dem Herz befestigt war. Von hier gelangte das Perfusat erneut der Schwerkraft folgend über die Vorhofkanüle in den linken Vorhof.

<sup>19</sup> Dideco Lilliput II®: Fa. Dideco, I- Mirandola

Vom linken Vorhof wurde das Perfusat in die linke Kammer und von hier erneut in die Aorta gepumpt, so dass der Kreislauf geschlossen war. Das koronarvenöse Blut, welches über den Sinus coronarius in den rechten Vorhof gelangte, wurde aus diesem über den rechten Ventrikel und die Pulmonalarterie ausgeworfen.

Dann wurde an die Kanüle in der Pulmonalarterie ein Silikonschlauch angeschlossen, über den das venöse Perfusat in das Reservoir unter dem Herz fließen kann.

Am Beginn der Perfusion wurde die Schlauchverbindung zwischen Oxigenator und Vorlastreservoir mit Hilfe einer Maschinenklemme unterbunden. Das oxigenierte Blut gelangte in diesem Zeitraum über einen zweiten Schlauch direkt in die Aorta ascendens, womit das Herz im „Langendorff- Modus“ retrograd perfundiert wurde. Das Blut gelangte hierbei retrograd in die Aorta und von hier antegrad in die Koronararterien. Die Aortenklappe verhinderte hierbei ein Einströmen des Perfusats in den linken Ventrikel. Nach 15 Minuten wurde diese Verbindung dann abgeklemmt und das Herz über den linken Vorhof im working- heart modus mit Perfusat versorgt. Um Temperaturschwankungen zu vermeiden, wurde das gesamte Perfusionssystem mit zwei getrennt regelbaren Warmwasserkreisläufen geheizt. Ein Wasserbad war an das doppelwandige Blutreservoir angeschlossen, das andere wärmte über einen Silikonschlauch, der im Gegenstromprinzip um das gesamte Schlauchsystem<sup>20</sup> gewickelt wurde, das restliche System.

Im Falle von während der Perfusion auftretenden Rythmusstörungen wurden die Herzen defibriert<sup>21</sup> und ggf. passager an einen externen Schrittmacher angeschlossen<sup>22</sup>.

---

<sup>20</sup> Extracorporal custom set: Fa hmt Medizintechnik GmbH, D- Fürstenfeldbruck

<sup>21</sup> Theracard 3661 D®: Fa Siemens Deutschland

<sup>22</sup> Medtronic demand Schrittmacher®: Fa. Medtronic, Inc., USA- Minneapolis

#### **2.4.2 Messung des Blutflusses**

Die Messung erfolgte durch Flowprobes und wurde online mit Hilfe eines PC-Monitors dargestellt und gespeichert.

#### **2.4.3 Druckmessung**

Die Drücke wurden mit Hilfe von Druckschläuchen, die über Dreiwegehähne an das Perfusionssystem angeschlossen waren, abgenommen. Die Druckumwandler<sup>23</sup> waren exakt auf der Höhe der Ventilebene des Herzens angebracht. Die Drücke wurden online dargestellt und gespeichert<sup>24</sup>.

#### **2.4.4 Temperaturmessung**

Die Messung erfolgte mit Hilfe von digitalen Temperatursonden im Oxigenator<sup>25</sup> unmittelbar vor dem Herzen und im Blutreservoir<sup>26</sup>.

### **2.5 Perfusat**

#### **2.5.1 Gewinnung von humanem Spenderblut**

Die Blutspender waren männlich und 22 bis 27 Jahre alt. In den Tagen vor der Blutentnahme hatten Sie keine Medikamte zu sich genommen, sie hatten keine Infektion, keine Allergien. Chronische Erkrankungen wurden von den Blutspendern verneint. Die Entnahme erfolgte über eine Armvene in zuvor heparinisierte (100 IU/ml) 50 ml Perfusorspritzen. Die Abnahme erfolgte parallel zur Herzexplantation, so dass das Blut nicht gelagert werden musste. Nach der Blutentnahme wurde die Blutgruppe mit einem Bedside- Test<sup>27</sup> bestimmt. Im Perfusionssystem wurde das Humanblut dann auf einen Hämatokrit von 30% mit Vollelektrolytlösung verdünnt.

---

<sup>23</sup> Physiological Pressure transducer: Fa. Madison, USA

<sup>24</sup> Sirecust 969, Fa Siemens USA

<sup>25</sup> Mit Online Temperatursonde: Fa Stöckert- Instrumente, D- München

<sup>26</sup> Mit Sirecust 969, Fa Siemens USA

<sup>27</sup> Serafol ABO: SIFIN GmbH, D- Berlin

### 2.5.2 Physiologische Sollwerte

Folgende Parameter wurden während der Perfusion über nebenstehenden Regelmechanismus konstant gehalten:

Parameter	Sollwert	einstellmechanismus
Temperatur	37,5° Celsius	Oxygenatortemperatur/ Heizschläuche um das Perfusionssystem
pO <sub>2</sub> arteriell	100 -150 mmHg	Dosierung O <sub>2</sub> über Oxygenator
pCO <sub>2</sub> arteriell	35 - 40 mmHg	Dosierung CO <sub>2</sub> über Oxygenator
pH	7,35 -7,45	CO <sub>2</sub> - Zufuhr bzw. Gabe von Bicarbonat <sup>28</sup>
Glukose	3,9 - 5,6 mmol/ l	Gabe von Glukose <sup>29</sup>
Calcium	2,2 - 2,6 mmol/ l	Gabe von Calcium <sup>30</sup>

Abb. 2.5: Physiologische Sollwerte

### 2.5.3 Medikamente

Die Konzentrationen der Medikamente wurden auf ein durchschnittliches Körpergewicht von 7 Kilogramm berechnet. Hieraus ergibt sich bei einem physiologischen Blutvolumen von 70ml /Kg Körpergewicht ein Volumen von 500 ml Blut als Perfusat.

Die Gabe von Tirofiban erfolgte der klinischen Anwendung entsprechend über einen Perfusor. Tirofiban- Hydrochlorid ist ein reversibler, nicht- peptidischer Inhibitor des Rezeptors IIb/IIIa auf Thrombozyten, welcher den Hauptrezeptor der

<sup>28</sup> Natriumhydrogenbicarbonat 8,4% Infusionskonzentrat®: Fa. B. Braun AG, D- Melsungen

<sup>29</sup> Glukose Lösung 50%®: Delta Pharma GmbH, D- Pfullingen

<sup>30</sup> Calcium- Braun 10%® :Fa. B.Braun AG, D- Melsungen

Thrombozytenaggregation darstellt. Die Applikation erfolgte über einen Perfusor. 30 Minuten vor Perfusionsbeginn begann die Applikation mit 0,16mg/ h, entsprechend 0,4 µg/ kg Körpergewicht/ Minute). Bei Anschluß des Herzens an das Perfusionssystem erfolgte eine Reduktion auf 0,04 mg/ h. Ebenfalls 30 Minuten vor Perfusionsbeginn wurden entsprechend der klinischen Applikation in der Tirofibangruppe 50 mg DL- lysinmono- Acetylsalicylsäure<sup>31</sup> als Bolus ins Perfusat gegeben. Der Perfusor war über einen Dreiwegehahn und eine Perfusorleitung an den venösen Zufluß zum Herzen angeschlossen. GAS 914 wurde in der zweiten Therapiegruppe 30 Minuten vor Perfusionsbeginn in das Perfusat gegeben. Die Konzentration betrug 1 mg/ Kg Körpergewicht, entsprechend sieben Gramm, Daraus ergibt sich eine Konzentration von 0,014 mg/ ml Perfusat.

---

<sup>31</sup> Aspisol®: Bayer Vital, Leverkusen, Germany



## 2.6 Versuchsablauf

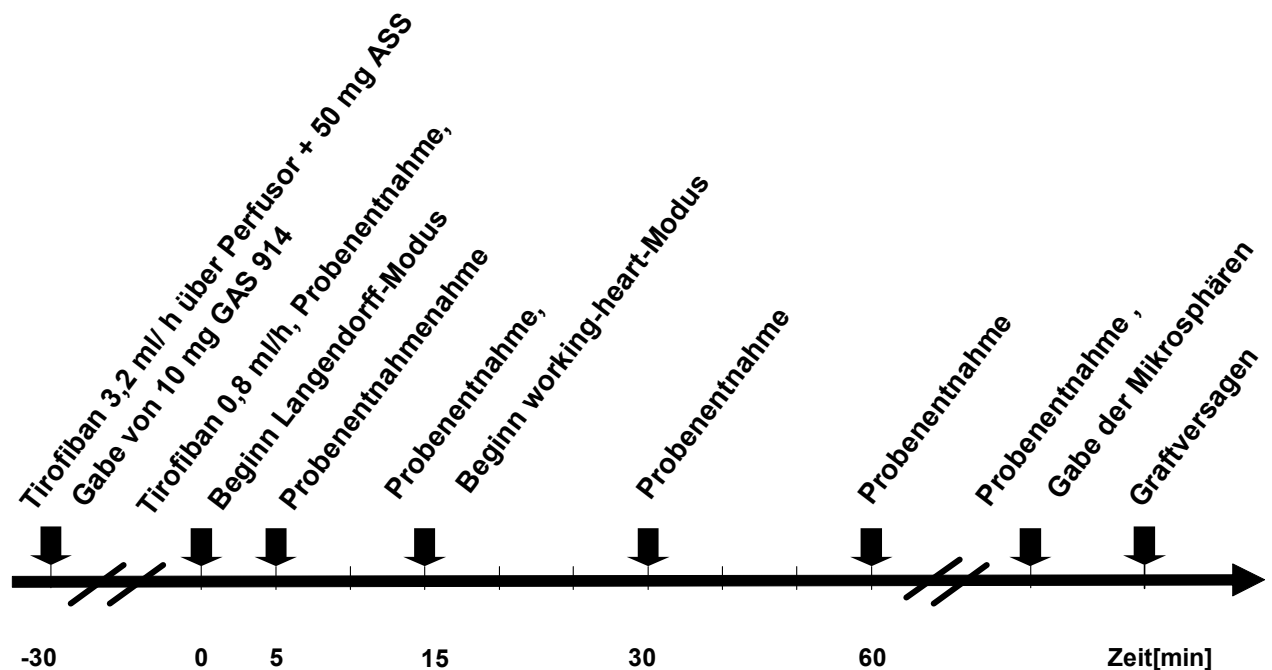


Abb. 2.6: Versuchsablauf

Bei den Probenentnahmen wurde sowohl arterielles, als auch venöses Perfusat entnommen. Das Versuchsende war durch das Versagen des Grafts (Herz) bestimmt. Dies war der Zeitpunkt, an dem das Herz die Nachlastsäule, entsprechend 55 mmHG, gerade nicht mehr mit der eigenen Pumpleistung überwinden konnte.

Das Herz wurde sofort aus dem Perfusionssystem entnommen und die einliegenden Kanülen entfernt, und die histologischen Proben zur Kontrolle der hDAF Expression entnommen. Anschließend wurde das Herz bis zur Auswertung der Mikrosphärenkonzentration in 10% Formaldehydlösung aufbewahrt.

## 2.7 Untersuchung der Mikrozirkulation

### 2.7.1 Untersuchungsprinzip

Eine exakte Darstellung der Verteilung des Blutflusses im nativen Herzen vor Xenoperfusion im Spendertier und nach Xenoperfusion im Perfusionssystem sollte mit der Mikrosphärentechnik erzielt werden (Glenny 1993, Prinzen 1994). Hierzu wurden fluoreszierende Mikrosphären (fMS) in den linken Vorhof appliziert. Diese wurden durch die hier und im linken Ventrikel vorhandenen Turbulenzen mit dem Blut homogen vermischt und gelangten dem natürlichen Blutfluss folgend, in die Koronararterien. Aufgrund ihrer Größe wurden die fMS im Kapillargebiet aufgefangen. Es stehen fMS verschiedener Farben zur Verfügung, sodass mehrere Applikationen erfolgen können. Vor Perfusionsbeginn wurden fMS einer Farbe noch im Spendertier appliziert, um die native Ausgangsverteilung zu bestimmen. Durch die Applikation einer weiteren Farbe nach Xenoperfusion konnte die Veränderung der Blutflußverteilung im Herzen während der Perfusion dargestellt werden. Die Fluoreszenz und somit die Menge an fMS im Gewebe wurde photometrisch bestimmt. Die Menge an fMS pro Gramm Gewebe in einem Segment des Herzens entspricht der Perfusatmenge, welche zum Zeitpunkt der Applikation dieses Gebiet durchfließt. Die absoluten Blutflüsse lassen sich dann nach folgender Formel bestimmen:

$$\text{OrgFlu\ss}^{32} = [ C_{\text{org}}^{33} \times ( V_f^{34} / C_{\text{ref}}^{35} ) ] / G_{\text{Probe}}^{36}$$

<sup>32</sup> OrgFlu\ss: dem Blutflu\ss im Gewebe in ml/ min / Gramm Gewebe  
<sup>33</sup> C<sub>Org</sub>: Menge an Mikosphären im Organ  
<sup>34</sup> V<sub>f</sub>: Abzugsgeschwindigkeit der Harvardpumpe in ml/ min  
<sup>35</sup> C<sub>ref</sub>: Menge an Mikosphären in einer Referenzprobe  
<sup>36</sup> G<sub>Probe</sub>: Gewicht der untersuchten Probe

In Vorversuchen wurde daher versucht, eine arterielle Referenzprobe mit einer Harvardpumpe aus der Aorta ascendens zu gewinnen. Da die Gabe der Mikrosphären im Perfusionssystem unmittelbar vor Graftversagen und somit bei gerade noch erreichter Nachlast erfolgen sollte, war der Blutfluß in der Aorta ascendens mit  $30,5 \text{ ml/min} \pm 11,3 \text{ ml/min}$  zu gering, um eine Referenzprobe sicher zu gewinnen. Da die Mikrosphärenapplikation in diesem Modell ebenso wie im etablierten in- vivo Modell direkt in den linken Vorhof erfolgte (Thein 2002, Chien 1995, Van Oosterhout 1995), konnte von einer homogenen Verteilung im Organ ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurden nur die Verteilung der fMS im Organ und die Unterteilung in endokardiale und epikardiale Verteilung der Mikrosphären, nicht aber der absolute Blutfluss bestimmt.

### **2.7.2 Applikation der fluoreszierenden Mikrosphären**

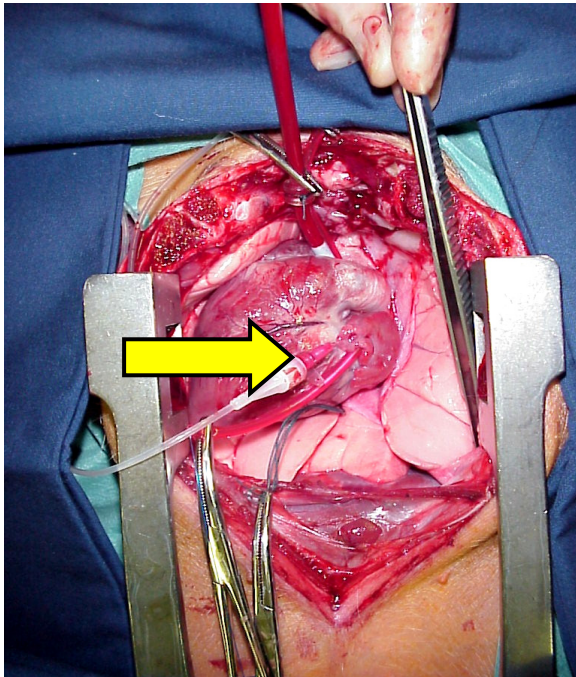
Es wurden zu beiden Zeitpunkten  $1 \text{ ml}$  ( $\triangleq 10^6 \text{ fMS}$ ) fluoreszierende Mikrosphären mit Kochsalzlösung<sup>37</sup> auf  $10 \text{ ml}$  verdünnt. Die Applikation im Spendertier erfolgte über eine Perfusorleitung und eine Venenverweilkanüle im linken Vorhof, die über eine Tabaksbeutelnaht fixiert war. Im Perfusionssystem wurden fMS einer anderen Farbe über einen Dreiwegehahn, über den ein  $15 \text{ Zentimeter}$  langer Venenverweilkatheter in den linken Vorhof vorgeschoben wurde, appliziert. Als Zugang für diesen Katheter wurde die zur ex- vivo Perfusion bereits im linken Vorhof liegende Kanüle verwendet. Die Applikationsdauer betrug  $15 \text{ Sekunden}$ .

Da die fMS über die Aorta ausgeworfen wurden, bestand die Gefahr, dass sie den Kreislauf durchlaufen, erneut zum Herzen rezirkulieren und somit die Messung verfälschen. Im natürlichen Organismus ist dies nicht möglich, da die fMS nahezu vollständig in der Lunge und im restlichen Organismus aufgefangen werden. Aus diesem Grund konnte im Perfusionssystem nur eine einzige Applikation von fMS am

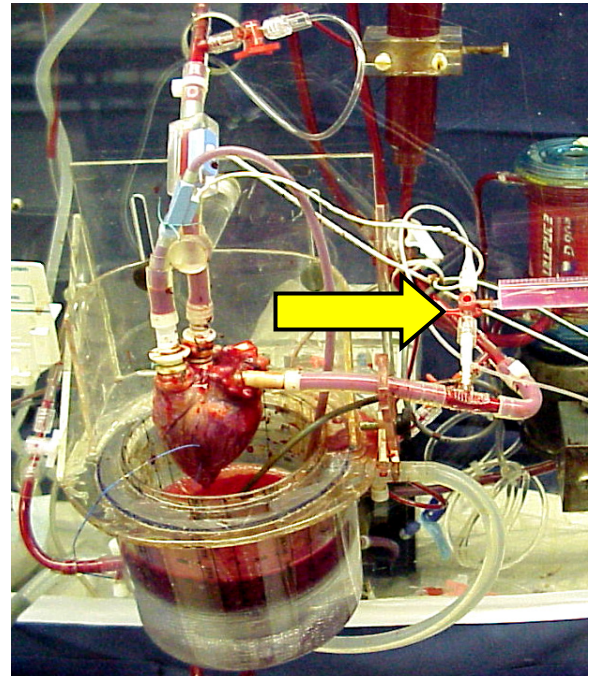
---

<sup>37</sup> Isotone Kochsalzlösung  $0,9\%^\circ$ : Fa. Braun, D- Melsungen

Versuchsende durchgeführt werden, da das coronarvenöse Perfusat hätte verworfen werden müssen, um eine Rezirkulation zu verhindern.



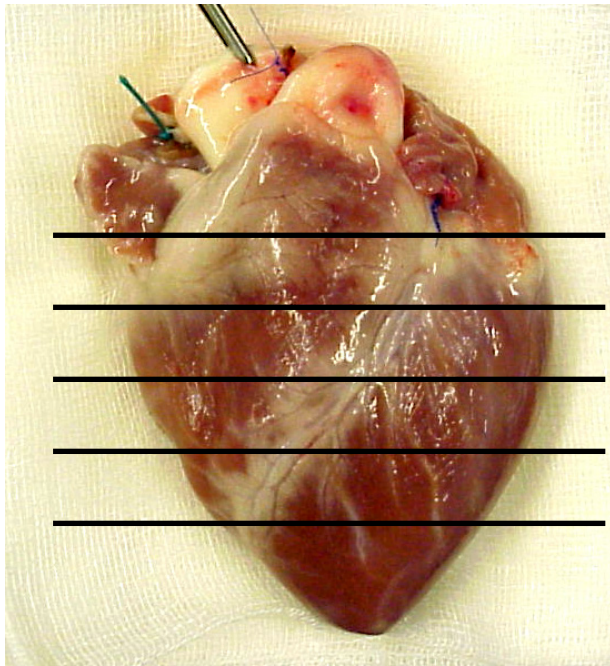
*Abb. 2.7: Applikation im Spendertier*



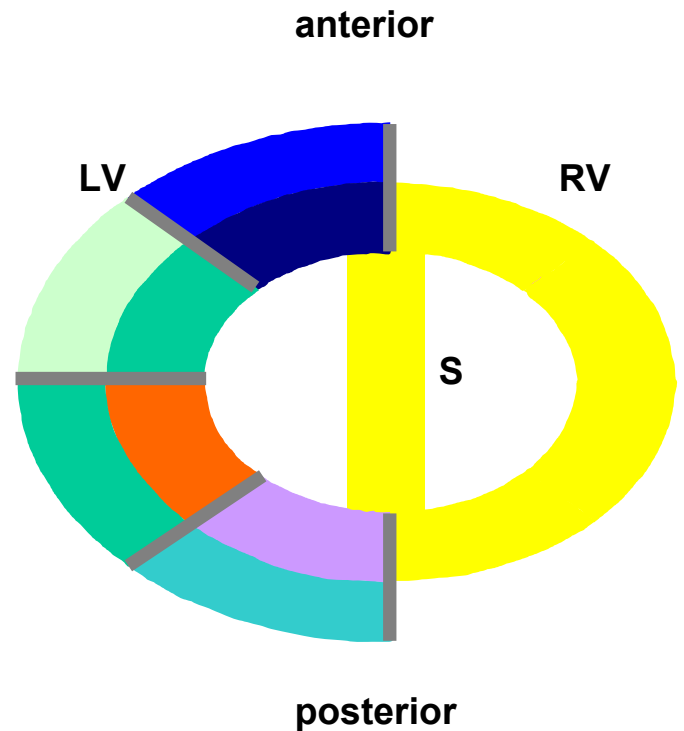
*Abb. 2.8: Applikation im ex-vivo-Modell*

### **2.7.3 Dissektionsschema**

Nach Perfusionsende wurde das epikardiale Fettgewebe und die großen Koronargefäße vorsichtig entfernt, um ausschließlich myokardiales Gewebe zu erhalten. Im Anschluss daran wurden die Schweineherzen unterhalb der Klappenebene in fünf gleich starke Schichten von apikal nach basal zerteilt. Der linke Ventrikel wurde weiter in vier gleich große Stücke zerteilt.



*Abb. 2.8: Dissektionsschema*



*Abb. 2.9: Aufteilung einer Schicht*

Um eine Veränderung des Verhältnisses der endomyokardialen zur epimyokardialen Miokrosphärenverteilung vor und nach Perfusion darzustellen (Endo-/ Epi- Ratio, EER), wurden die Proben des linken Ventrikels zusätzlich noch in ein endomyokardiales und ein epimyokardiales Segment unterteilt. Die Proben wurden in 10%iger Formaldehydlösung maximal eine Woche konserviert.

#### **2.7.4 Probenaufbereitung**

Die Aufbereitung der Proben erfolgte im Institut für Chirurgische Forschung<sup>38</sup> mit der von Thein et al. beschriebenen automatisierten Methode (Thein 1999, 2000, Raab 1999). Die Proben wurden zunächst gewogen und in sample processing units (SPU) gegeben. Mit 4 molarer KOH Lösung und 1,5 ml Isopropanol wurde das Gewebe in den Proben dann aufgelöst. Dies geschah bei 60° C über einen Zeitraum von 6 Stunden. Nachdem das Gewebe aufgelöst war, wurden die Proben auf dem Filter im Boden der SPU mit 15 ml Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit 2800 Umdrehungen/ min für eine Minute zentrifugiert. Das Spülen,

<sup>38</sup> ICF der LMU München, Marchioninistr. 15, D- München

Waschen und Zentrifugieren wurde einmal wiederholt. Um den fluoreszierenden Farbstoff von den fluoreszierenden Mikrosphären zu trennen, wurden die Proben mit 1 ml organischem Lösungsmittel durch ein 30 sekündiges Ultraschallbad aufgelöst. Nach erneutem Auflösen wurde dann die fluoreszierende Farblösung durch Zentrifugieren bei 2800 Umdrehungen/ min für eine Minute extrahiert. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität wurden 550 µl der Lösung abpipetiert und im Photometer gemessen. Die Fluoreszenzintensität wurde dann durch das jeweilige Gewicht der Probe dividiert, sodass man die Fluoreszenzintensität pro Gramm Herzmuskelgewebe erhielt, welche den im Gewebe abgelagerten fMS entsprach.

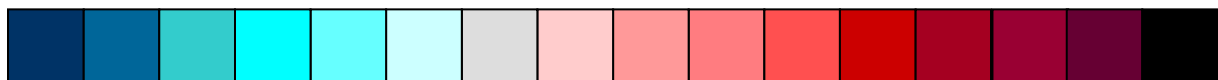
### 2.7.5 Darstellung der Ergebnisse

Nach Bestimmung der Fluoreszenzintensität pro Gramm Gewebe konnte die Endo-/ Epi- Ratio für jedes Segment nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{EER} = \frac{\text{Fluoreszenzintensität pro Gramm Gewebe endomyokardial/}}{\text{Fluoreszenzintensität pro Gramm Gewebe epimyokardial}}$$

Jedem Wert der EER wurde eine Farbe nach folgendem Schema zugeteilt:

0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1 1,1 1,2 1,3 1,4 1,5 1,6 1,7 1,8 1,9



## **2.8 Makrozirkulation**

Die Messzeitpunkte entsprachen denen der Probenentnahme aus dem Perfusat, also nach 5, 15, 30, 60 Minuten und bei Graftversagen.

### **2.8.1 Koronarfluss**

Da der einzige Zufluss zum rechten Vorhof und somit auch zum rechten Ventrikel ausschließlich aus koronarvenösem Perfusat bestand, konnte der Koronarfluss mit einer Flowprobe in der Pulmonalarterie dargestellt werden.

### **2.8.2 Koronarwiderstand**

Der Koronarwiderstand wurde aus dem Quotienten aus mittlerem arteriellen Druck und Koronarfluss errechnet.

$\text{Koronarwiderstand [arbitrary units]} = \text{MAP} / \text{Koronarfluss}$
---

### **2.8.3 Cardiac output (CO)**

Der Cardiac Output wurde ebenfalls mit Hilfe einer Flowprobe in der Aorta ascendens online dargestellt.

### **2.8.4 Arterieller Druck (systolisch, diastolisch, mean arterial pressure: MAP)**

Die arterielle Druckmessung erfolgte unmittelbar distal der Kanüle in der Aorta ascendens. Gemessen wurden systolischer und diastolischer Druck, sowie der Mitteldruck (MAP). Die Drücke wurden online dargestellt (s.2.2.2).

### **2.8.5 Venöser Druck (left atrial pressure: LAP)**

Der venöse Druck wurde unmittelbar vor der Kanüle im linken Vorhof, über die das oxygenierte Blut wieder zum Herzen gelangt, gemessen und analog zum arteriellen Druck online dargestellt.

### **2.8.6 Arterio- Venöse- Sauerstoff- Differenz (AVDO<sub>2</sub>)**

Die Sauerstoffextraktion der Schweineherzen aus dem Perfusat wurde mit der  $AVDO_2$  dargestellt. Sie gibt die Sauerstoffmenge an, die pro Minute aus 100 ml Perfusat von 100 Gramm Gewebe relativ zum Perfusatfluss entnommen wird. Blutgasanalysen wurden aus der Aorta ascendens ( $S_{art}$ ) und der Pulmonalarterie ( $S_{ven}$ ) entnommen.

**$AVDO_2$  [ml  $O_2$ / 100 ml Blut] =**

$$(1,34 \times Hb \times S_{art} \times 10^3) - (1,34 \times Hb \times S_{ven} \times 10^3)$$

### 2.8.7 Schlagarbeitsindex (SAI)

Mit dem SAI wird die Leistung des Herzens pro Gramm Gewebe dargestellt. Er berechnet sich mit folgender Formel:

**SAI [1 erg. (Erg)] =**

$$10^{-7} \text{ Joule} = [(MAP - LAP) \times CO \times 1333] / HF \times \text{Herzgewicht}$$

## 2.9 Laboruntersuchungen

Zunächst wurden alle Parameter im nativen Blut des Spenders bestimmt. Die Probengewinnung im Perfusionsystem erfolgte arteriell aus der Aorta ascendens und venös aus der Pulmonalarterie. Unmittelbar vor dem Anschluß des Herzens an das Perfusionssystem erfolgte die Probenentnahme zur Bestimmung des Ausgangswertes im Perfusionssystem. Während der Perfusion wurde nach 5, 15, 30, 60 Minuten und bei Graftversagen sowohl venöses, als auch arterielles Perfusat entnommen (siehe Zeitschema Versuchsablauf 2.6). Die Probenentnahme erfolgte für die Gerinnungsparameter in Citratröhrchen<sup>39</sup>, für alle anderen Untersuchungen in EDTA- Röhrchen<sup>40</sup>.

<sup>39</sup> Primavette (S) Coagulation®: Fa. Kabe Labortechnik GmbH, D- Numbrecht- Elseroth

<sup>40</sup> Primavette (P) EDTA®: Fa. Kabe Labortechnik GmbH, D- Numbrecht- Elseroth



### **2.9.1 Gerinnungsparameter**

Um die Auswirkungen der Gerinnungsaktivierung nach hyperakuter Abstoßung im Blutbild erfassen zu können und um die Effektivität der Therapie mit Tirofiban zu überprüfen, wurden Protein C (Prot C), Antithrombin III (AT III), Fibrinogen (Institut für klinische Chemie, Klinikum Großhadern, Ludwig- Maximilians- Universität München) und die Thrombozytenzahl (Coulter<sup>41</sup>) bestimmt.

### **2.9.2 Herzenzyme**

Als Maß für die kardiomyozytäre Schädigung des Herzen wurden Creatininphosphokinase (CK), herzspezifische Creatininphosphokinase (CK- MB), Laktatdehydrogenase (LDH) und Glutamat- Oxalacetat- Transaminase (GOT) bestimmt (Institut für klinische Chemie, Klinikum Großhadern, Ludwig- Maximilians- Universität München)

### **2.9.3 Komplement**

Die effektive Blockade der Komplementkaskade, sowohl durch hDAF, als auch indirekt über GAS 914, sollte über die Bestimmung der Komplementfaktoren C3 und C4 überprüft werden (Institut für klinische Chemie, Klinikum Großhadern, Ludwig- Maximilians- Universität München).

## **2.10 Antikörper**

### **2.10.1 Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal**

Die Konzentrationen der Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgG und IgM Antikörper wurden jeweils getrennt, jedoch nach dem gleichen Schema bestimmt. Zwei Mikrotiterplatten wurden über Nacht jeweils mit Gal $\alpha$ (1,3)- Gal $\beta$ 1,4GlcNAc- HAS<sup>42</sup> oder mit PBS<sup>43</sup> bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten einmal mit einem Gemisch aus PBS,

---

<sup>41</sup> Coulter ACT®: Fa. Coulter Electronics , Krefeld Germany

<sup>42</sup> Fa.: Dextra Labs, Reading, UK

<sup>43</sup> PBS: phosphate buffered saline: Fa.: ICN, Costa Mesa, USA

Tween 20<sup>44</sup> und mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Wells mit einer Blockierlösung aus PBS und Tween 20 aufgefüllt und eine Stunde bei Umgebungstemperatur belassen. Die bei 56 °C für 30 Minuten hitzeinaktivierten Proben wurden nun in einer Verdünnungsreihe von 1 : 2,5 bis 1 : 1280 auf die Platten pipettiert und erneut eine Stunde bei Umgebungstemperatur inkubiert. Danach wurde Peroxidase- konjugiertes Anti- human IgG/ IgM<sup>45</sup> in einer Verdünnung von 1: 1000 hinzu gegeben. Nach siebenmaligem Waschen wurden die Platten für eine Stunde bei Umgebungstemperatur inkubiert.

Das Substrat Phenylendiamindihydrochlorid<sup>46</sup> wurde anschließend hinzugefügt und die Farbreaktion wurde mit einmolarer Schwefelsäure gestoppt.

Die Absorption wurde bei 490 nm in einem ELISA- Reader gelesen. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde die Fläche unter den Titrationskurven integriert und zu area under the curve (AUC) – Werten berechnet. Diese Werte wurden mit einem humanen Standardserum, das bei jeder Messung mitgemessen wurde, und dessen AUC auf 1000 festgelegt wurde, ins Verhältnis gesetzt.

Um eine nichtspezifische Bindung von Serumantikörpern auszuschließen, wurde immer eine zweite, nur mit Puffer behandelte Platte mitgemessen und von den Messwerten subtrahiert.

### **2.10.2 Anti- Schwein- hämolytische Antikörper**

Das Prinzip des Tests besteht aus der Messung der Antikörper im humanen Serum, die in der Anwesenheit von Komplement (Baby Rabbit Komplement) die Fähigkeit haben, rote Blutkörperchen von Schweinen (pig red blood cells / PRBC) zu lysieren. Zunächst wurden die Proben bei 4000 U/ min 20 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Serumüberstand in Eppendorf- Gefäße verbracht wurde, wurde er bei 56 °C für 30

---

<sup>44</sup> Tween 20: Fa.: Sigma, St. Luis , USA

<sup>45</sup> Fa.: Dextra Labs, Reading, UK

<sup>46</sup> Fa.: Sigma, St. Luis , USA

Minuten hitzeinaktiviert und erneut fünf Minuten bei 17000 G zentrifugiert, um Kleinstpartikel und Lipide zu entfernen. Dann wurde mit Complement Fixation Test Diluent (CFD) eine Verdünnungsreihe von 1: 2,5 bis 1: 1280 mit jeder Probe auf einer Mikrotiterplatte<sup>47</sup> erstellt. Nach Hinzufügen der Schweinebluterythrozyten wurden die Platten eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Bei Umgebungstemperatur wurden die Platten nach Zugabe von 100 µl CFD bei 500 G für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, es wurde erneut 200 µl CFD hinzu gegeben und die Platten wurden wieder mit 500 G für zehn Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Baby Rabbit Komplement dazu gegeben und die Platten wurden bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Abschließend wurden die Platten bei 500 G zehn Minuten zentrifugiert und jeweils 100 µl des Überstands in Elisa – Reader Platten<sup>48</sup> pipettiert, um bei 420 nm die Absorption zu messen.

Wie bei den Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Antikörpern wurde die Fläche unter den Titrationskurven integriert und zu (area under the curve) AUC – Werten berechnet und dann mit 1000 AUC Einheiten eines humanen Kontroll- Standards ins Verhältnis gesetzt.

### **2.10.3 IgG und IgM Immunglobuline**

Die Konzentrationen wurden im Institut für klinische Chemie, Klinikum Großhadern aus den während den Versuchen gewonnenen Proben in Serumröhrchen bestimmt.

### **2.11 Herzgewicht**

Um die durch Ödembildung entstehende Gewichtszunahme der Herzen während der Perfusionsdauer erfassen zu können, wurden die Herzen vor und nach Perfusion gewogen und der prozentuale Gewichtszuwachs bestimmt.

---

<sup>47</sup> Nunc Polysorb 96 well, flat bottom: Fa.: Nunc, DK

<sup>48</sup> Nunc Polysorb 96 well, flat bottom: Fa.: Nunc, DK

## **2.12 Perfusionsdauer**

Als Überlebenszeit wurde die Zeit vom Beginn der Perfusion bis zum terminalem Graftversagen, wenn das Herz das Perfusat gerade nicht mehr in das Nachlastreservoir pumpen konnte, gemessen.

## **2.13 Statistik**

Die Daten wurden zunächst auf ihre Normalverteilung überprüft. Da die Werte nicht normalverteilt waren, wurde der Median, sowie die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet. Für den Vergleich der Gruppen untereinander wurde nach der two way- ANOVA Analyse der Tukey Test verwendet. Faktoren waren die Versuchsgruppe und der Zeitpunkt. Die Signifikanzschwelle wurde bei  $p < 0,05$  festgesetzt.

Die statistische Auswertung der Gruppenunterschiede bei der EER erfolgte mit dem Wilcoxon Signed Rank Test. Das Signifikanzniveau wurde hier bei  $p < 0,001$  festgelegt.

### **3. Ergebnisse**

Die Ergebnisse sind in zwei Teilen dargestellt:

Im Rahmen des ersten Teils (3 a) werden die Gruppen A (Landrasse) , B (hDAF) und C (hDAF mit Tirofiban) verglichen

Der zweite Teil (3 b) zeigt den Vergleich der Gruppen A (Landrasse), B (hDAF) und D (hDAF mit GAS 914).

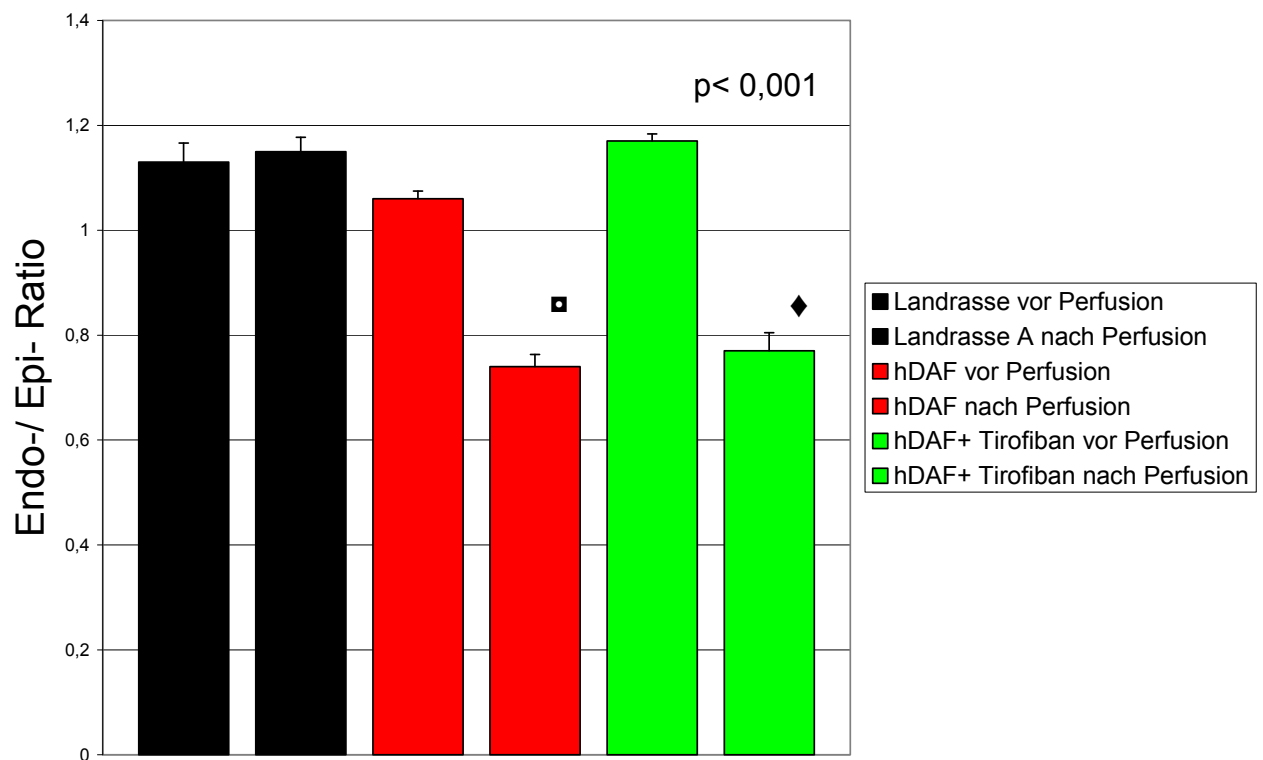
Im ersten Teil liegt der Schwerpunkt auf der Beurteilung der Veränderung der Gerinnungsaktivität, im zweiten Teil wird verstärkt der Einfluß der Antikörper und des Komplementsystems untersucht.

### 3.a Beeinflussung der hyperakuten Abstoßungsreaktion durch

#### hDAF und Tirofiban

##### 3.a.1 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung im gesamten linken Ventrikel

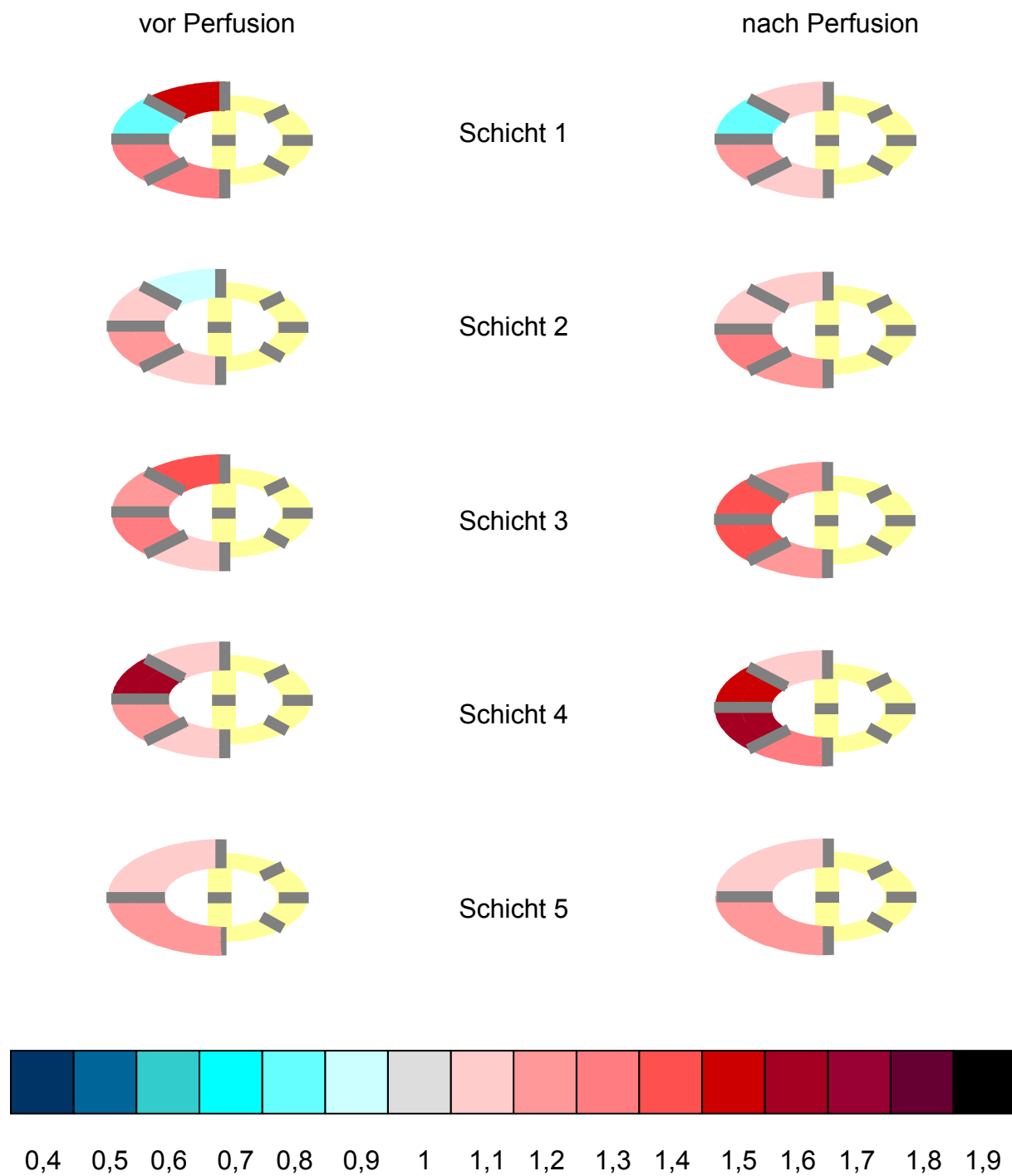
Bei den Landrasseherzen in Gruppe A zeigte sich eine leichte Zunahme der EER von  $1,13 \pm 0,71$  auf  $1,15 \pm 0,53$ . Bei den transgenen Herzen der Gruppe B fiel die EER von  $1,06 \pm 0,29$  auf  $0,74 \pm 0,45$  ab. Ein vergleichbarer Abfall von  $1,17 \pm 0,27$  auf  $0,77 \pm 0,68$  war in Gruppe C zu verzeichnen. In den Gruppen B und C war der Abfall signifikant.



Signifikanz Gruppe B vor/ nach Perfusion	■
Signifikanz Gruppe C vor/ nach Perfusion	◆

Abb. 3.a.1: Endo-/ Epikardiale Blutflußverteilung im gesamten linken Ventrikel  
(Signifikanz: vor vs nach Perfusion)

### 3.a.2 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der Landrasseherzen



3.a.2: Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der Landrasseherzen

Bei den Landrasseherzen (Gruppe A) zeigte sich nach Xenoperfusion im Vergleich zur ursprünglichen Verteilung im Schwein keine wesentliche Veränderung des Verhältnisses von endokardialer zu epikardialer Verteilung der Mikrosphären im Myokard. Auf das gesamte Herz berechnet betrug die EER vor Xenoperfusion  $1,13 \pm 0,71$  und am Ende der Perfusion  $1,15 \pm 0,53$ .

Es war damit kein wesentlicher Unterschied der EER zwischen den verschiedenen Schichten zu erkennen. Lediglich in Schicht eins zeigte sich ein Bereich, in dem das Verhältnis kleiner als eins war.

### **3.a.3 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF- transgenen Herzen**

Bei den transgenen Herzen (Gruppe B) war vor Xenoperfusion mit einem Verhältnis von 0,7 nur in Schicht fünf ein wesentlicher Unterschied zum restlichen Herzen mit einem mittleren Verhältnis von  $1,06 \pm 0,29$  zu verzeichnen. Am Perfusionsende fiel das Verhältnis dann auf  $0,74 \pm 0,45$  ab. Auch in Schicht fünf nahm das Verhältnis auf 0,5 ab. Ein nicht signifikanter Trend zum Abfall der EER von  $0,95 \pm 0,49$  basal (Schicht 1) auf eine EER von  $0,46 \pm 0,45$  apikal (Schicht 5) war bei Abstoßung zu verzeichnen.



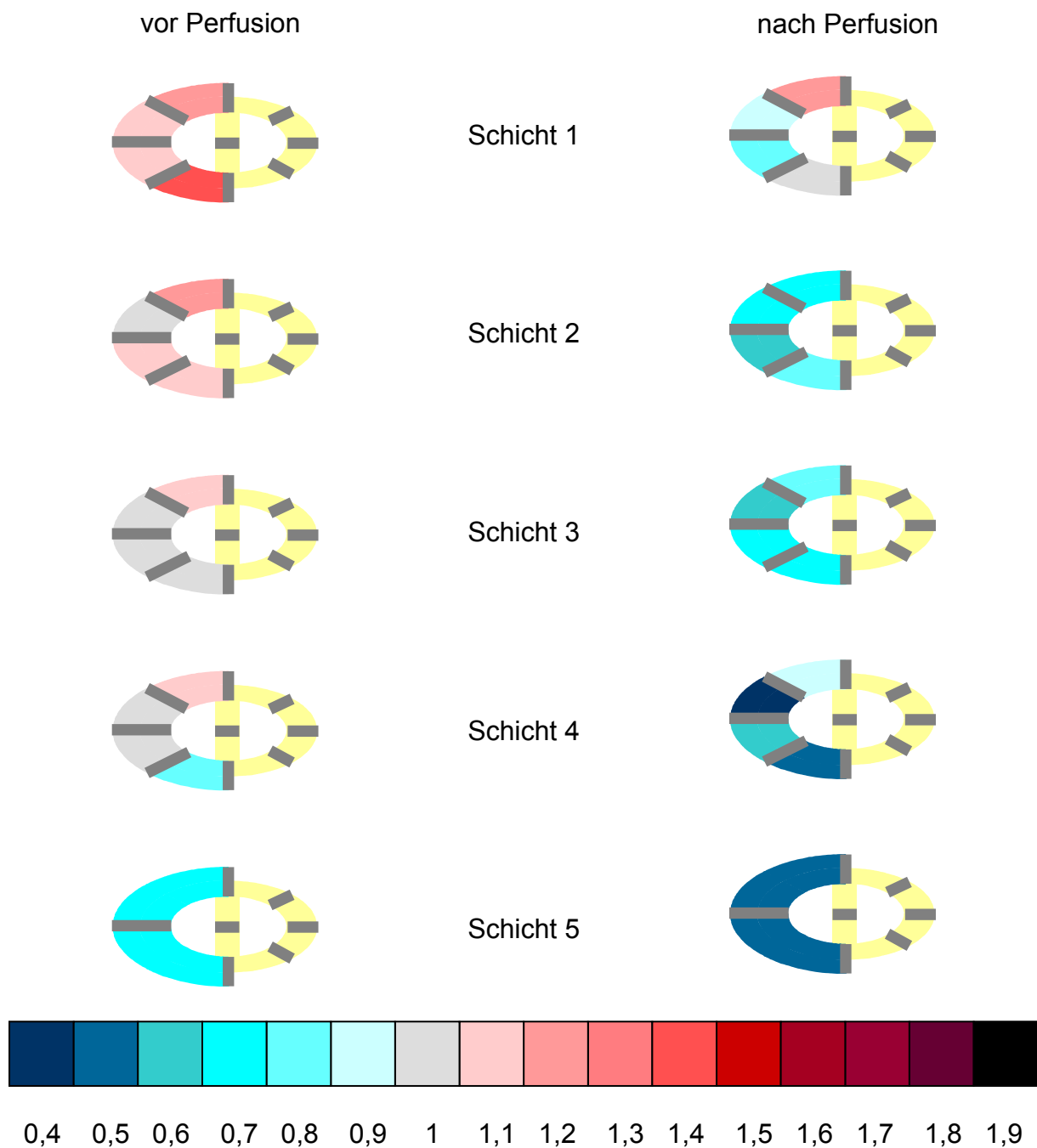
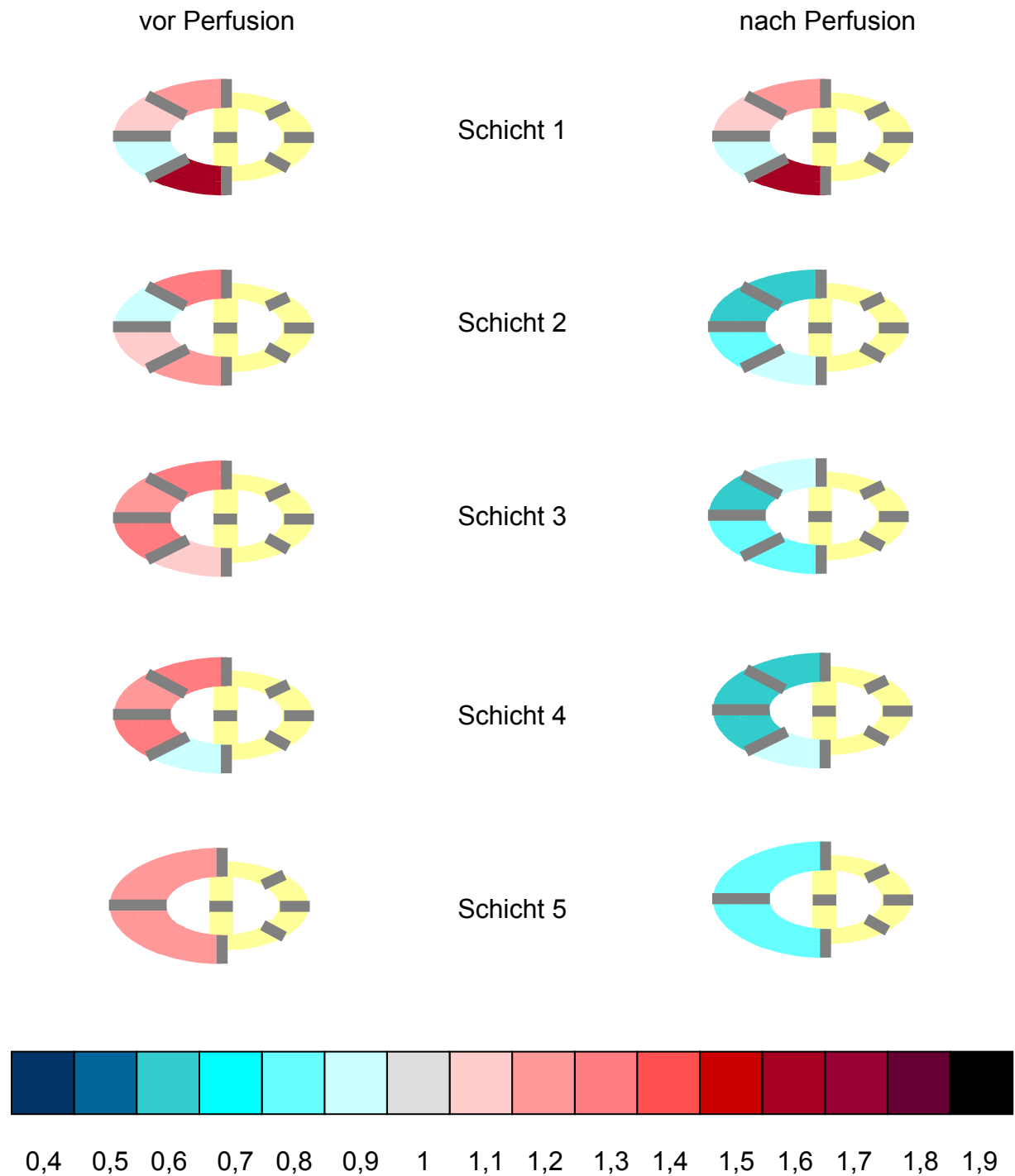


Abb. 3.a.3: Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF- transgenen Herzen

### 3.a.4 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF- transgenen Herzen mit Tirofiban

In der Tirofiban- Gruppe betrug die EER vor Xenoperfusion ähnlich den beiden anderen Gruppen  $1,17 \pm 0,27$ . Am Ende der Perfusion sank das Verhältnis auf  $0,77 \pm 0,68$  ab. Im Vergleich zur Gruppe B war kein verstärktes Absinken der EER an der

Herzspitze zu erkennen. An der Herzbasis zeigte sich in allen vier Segmenten keine Veränderung der EER.



*Abb. 3.a.4- Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF- transgenen Herzen mit Tirofiban*

### 3.a.5 Makrozirkulation

#### 3.a.5.1 Koronarfluss

Zu Beginn der Perfusion stieg in Gruppe A der Koronarfluss auf  $0,92 \pm 0,45$  ml/ min/ g nach 15 Minuten Perfusionsdauer an. Zum selben Zeitpunkt betrug der Koronarfluss  $0,72 \pm 0,32$  ml/ min/ g in Gruppe B und  $0,55 \pm 0,11$  ml/ min/ g in Gruppe C. Danach fiel der Fluss zum Perfusionsende hin in Gruppe A kontinuierlich auf  $0,62 \pm 0,36$  ml/min/g ab. In Gruppe B wurde nach 60 Minuten ein Fluss von  $0,89 \pm 0,38$  ml/ min/ g erreicht und dieser stieg bis zum Perfusionsende auf  $0,99 \pm 0,28$  ml/ min/ g an. Der Anstieg war in Gruppe C langsamer, erreichte aber mit  $1,15 \pm 0,75$  ml/ min/ g den größten Koronarfluss am Perfusionsende.

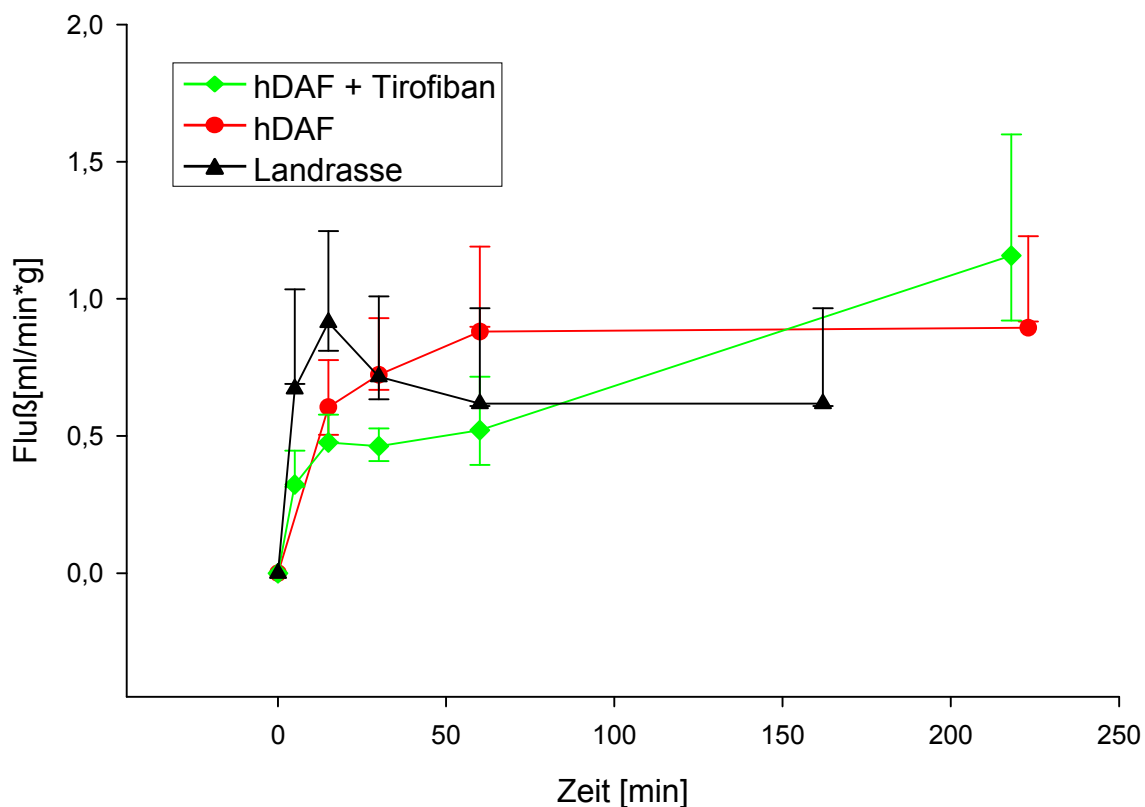


Abb. 3.a.5: Koronarfluss/ Gramm Herzgewicht

### 3.a.5.2 Koronarwiderstand

In Gruppe A stieg der Koronarwiderstand im Laufe der Perfusion auf  $1,56 \pm 0,25$  mmHg\* min/ ml nach 30 Minuten an und verblieb bis zum Perfusionsende mit  $1,49 \pm 0,28$  mmHg\* min/ ml auf hohem Niveau. Der KW stieg in Gruppe B auf  $0,8 \pm 0,7$  mmHg\* min/ ml nach 60 Minuten und fiel zum Perfusionsende hin leicht ab. In Gruppe C war der KW zu Beginn mit  $1,82 \pm 0,68$  mmHg\* min/ ml am höchsten, fiel dann aber kontinuierlich auf  $0,53 \pm 0,13$  mmHg\* min/ ml ab.

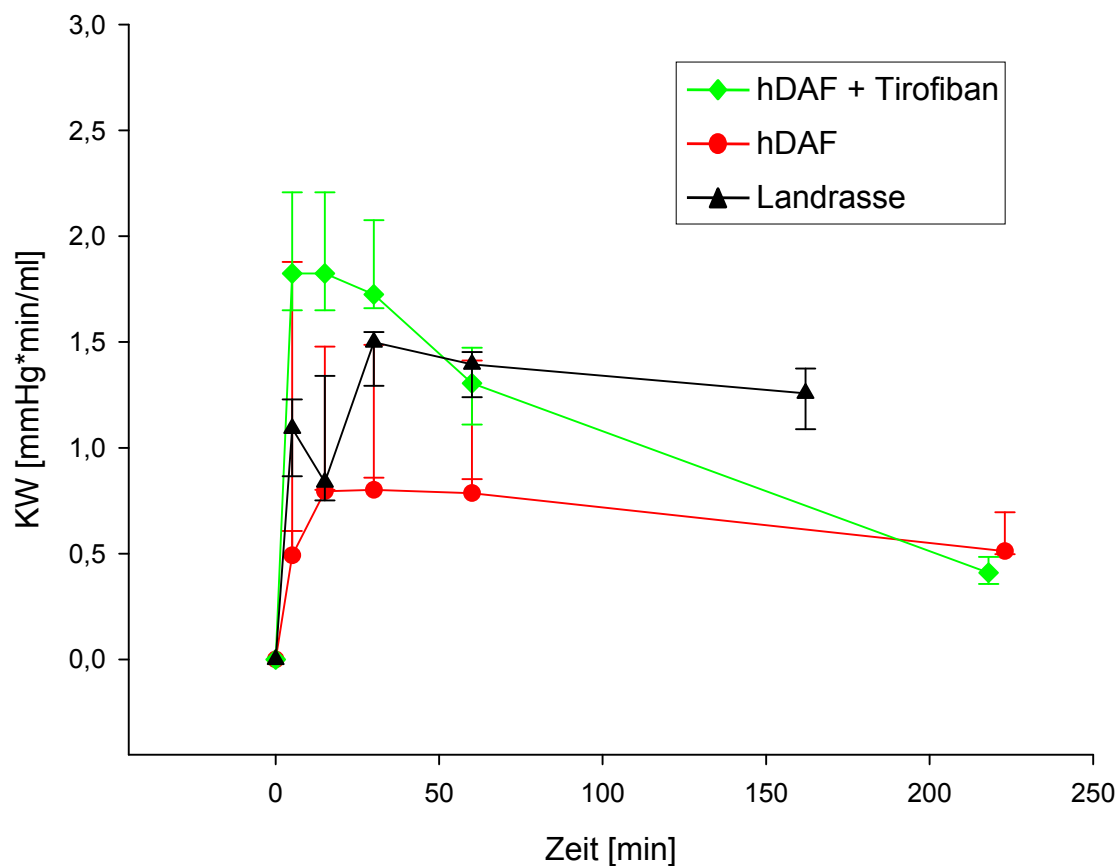


Abb. 3.a.6: Koronarwiderstand

### 3.a.5.3 Herzzeitvolumen

Zunächst stieg das Herzzeitvolumen in allen Gruppen an, und fiel dann kontinuierlich bis zum Versuchsende ab. In Gruppe B war ein deutlich stärkerer Anstieg auf  $3,6 \pm 1,6$  ml/ min/ g nach 30 Minuten zu verzeichnen.

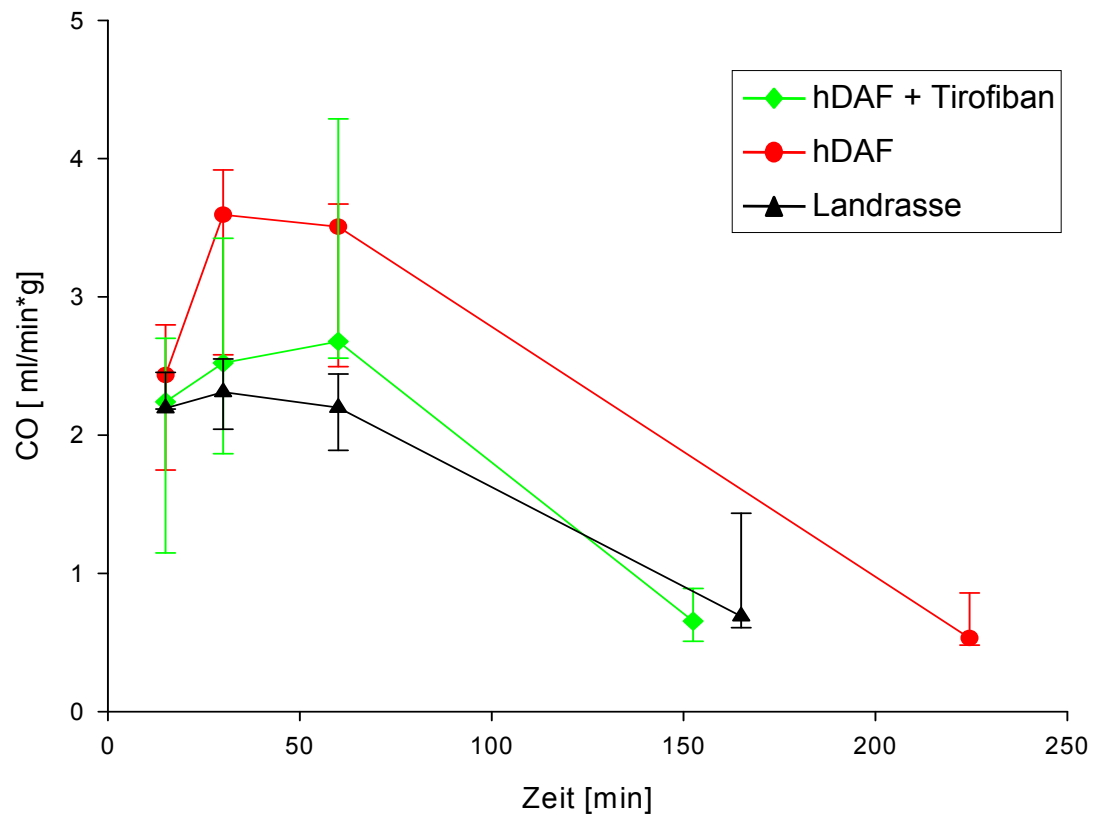
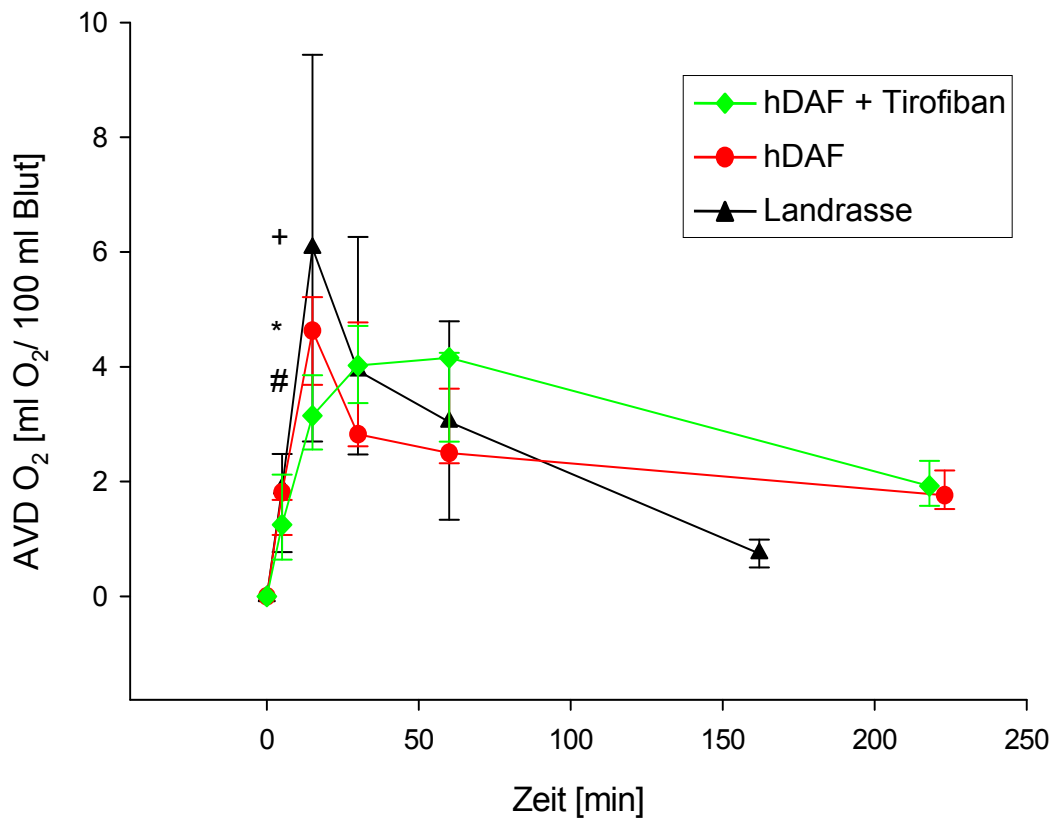


Abb.3.a.7: Herzzeitvolumen [ml/min/g]

### 3.a.6 Arterio- venöse Sauerstoffdifferenz

Es zeigte sich ein stärkerer Anstieg der Sauerstoffextraktion bei den Landrasseherzen auf  $6,1 \pm 4,7$  ml O<sub>2</sub>/ 100 ml Blut nach 15 Minuten. In Gruppe B stieg die AVDO<sub>2</sub> zum gleichen Zeitpunkt auf  $4,4 \pm 1,9$  ml O<sub>2</sub>/ 100 ml Blut an.



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	+
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	*
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	#

Abb. 3.a.8: Arterio- venöse Sauerstoffdifferenz

Ein langsamerer Anstieg auf  $4,5 \pm 1,7$  ml O<sub>2</sub>/ 100 ml Blut nach 60 Minuten war in Gruppe C zu verzeichnen. Zum Ende der Perfusion fiel die Sauerstoffextraktion in Gruppe A von  $0,75 \pm 0,3$  ml O<sub>2</sub>/ 100 ml Blut am stärksten ab.

### 3.a.7 Schlagarbeitsindex

Der SAI stieg in allen Gruppen an und fiel bis Ende der Perfusion kontinuierlich ab. Gruppe A hatte mit  $1460 \pm 285$  ergs/ s nach 15 Minuten die schlechteste Pumpfunktion. Gruppe C erreichte  $1955 \pm 1644$  ergs/ s nach 30 Minuten und Gruppe B zum selben Zeitpunkt  $2508 \pm 1644$  ergs/ s.

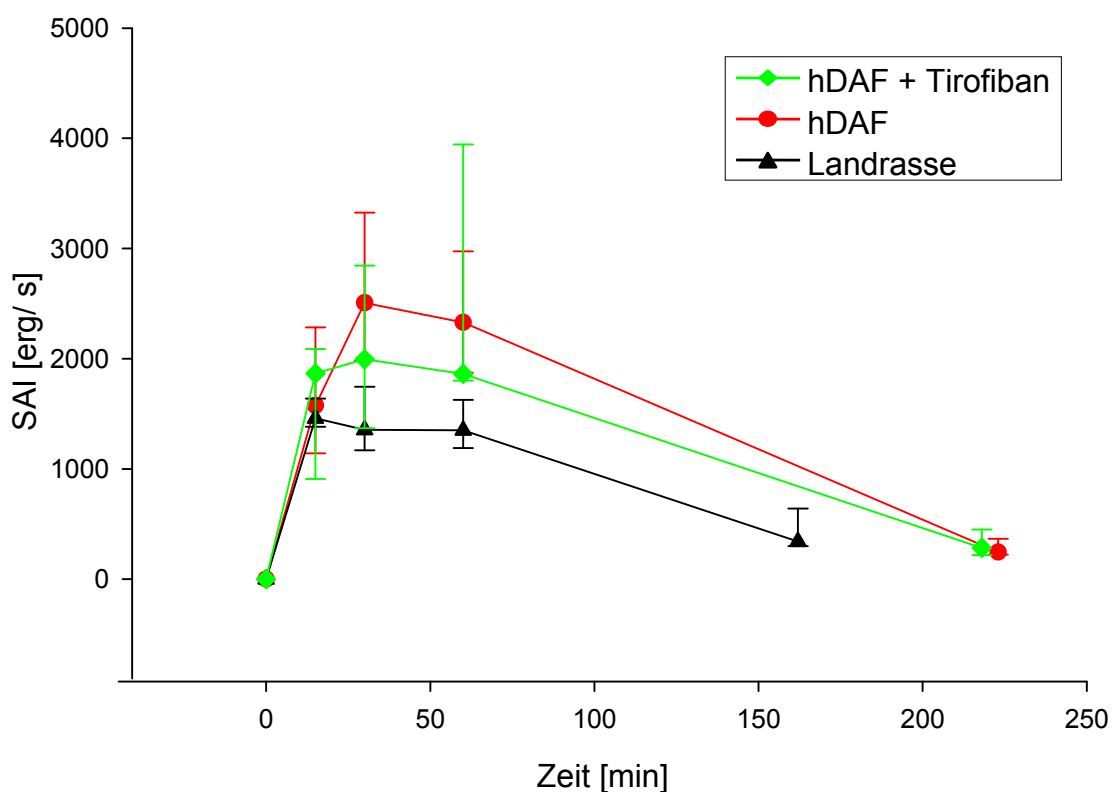


Abb. 3.9: Schlagarbeitsindex

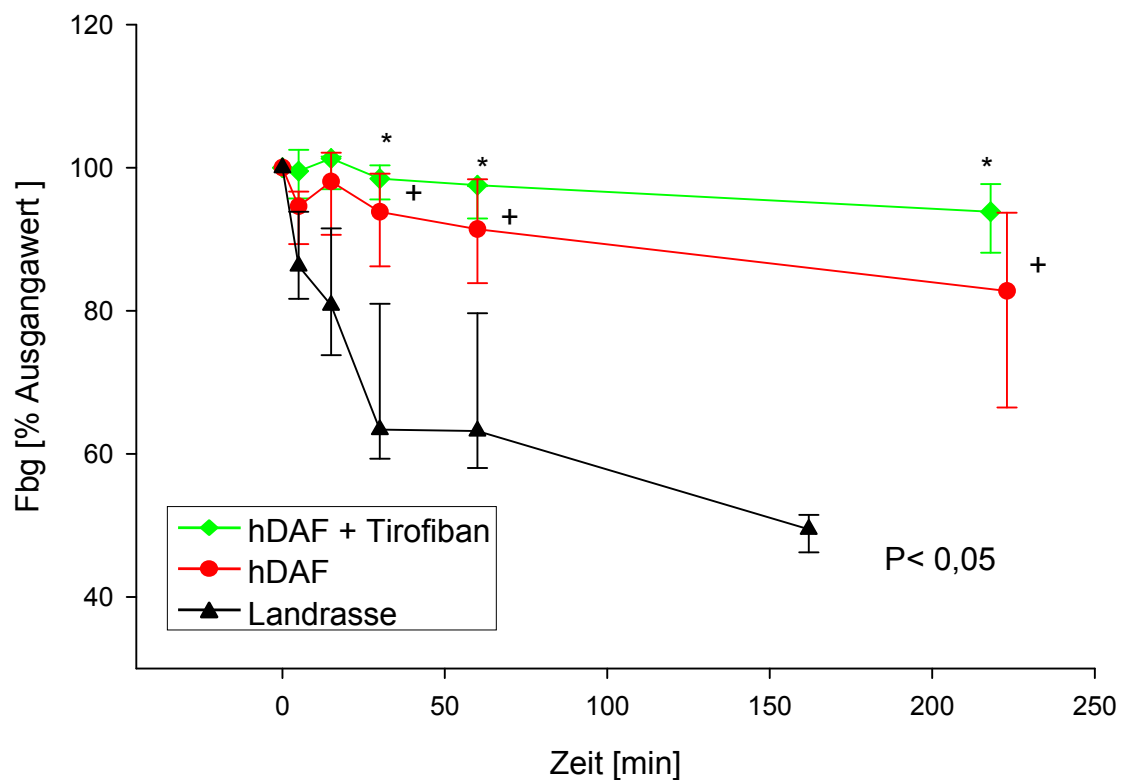
### 3.a.8 Laboruntersuchungen

#### 3.a.8.1 Gerinnungsparameter

Die Werte der Gerinnungsparameter sind prozentual dargestellt. 100% entsprechen der Konzentration im Perfusat zu Perfusionsbeginn.

### 3.a.8.1.1 Fibrinogen

Während die Fibrinogenkonzentration in den Gruppen mit hDAF- transgenen Herzen nach einer Stunde immer noch  $97,6 \pm 5,5$  % (Gruppe C) und  $91,4 \pm 17,8$  % (Gruppe B) des Ausgangswertes betrug, fiel sie in der Kontrollgruppe zum selben Zeitpunkt auf  $71,24 \pm 17,3$  % ab. Bei 30, 60 min, sowie am Versuchsende waren die Unterschiede gegenüber den Kontrollherzen in beiden Therapiegruppen signifikant.



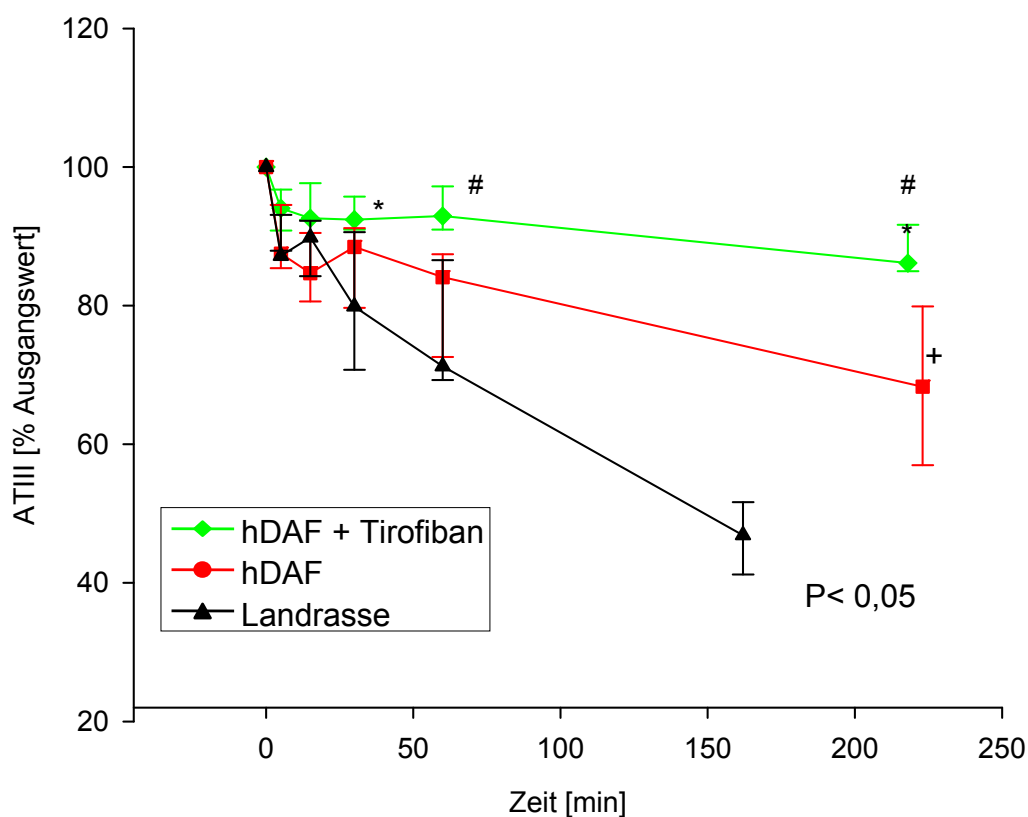
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	+
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	*
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	#

Abb. 3.a.10: Fibrinogenverbrauch



### 3.a.8.1.2 Antithrombin III

In Gruppe C fiel die Konzentration von AT III nur auf  $86,15 \pm 8,2$  % des Ausgangswertes ab. Es zeigte sich ein deutlich stärkerer Abfall in Gruppe B auf  $68,3 \pm 25,6$  % und eine Abnahme auf  $46,9 \pm 9$  % bei den Landrasseherzen. Der Antithrombin III- Verbrauch war in beiden Therapiegruppen bei 30, 60 min und bei Abstoßung signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Durch Tirofiban wird der Verbrauch von AT III weiter verringert (signifikant bei Abstoßung).



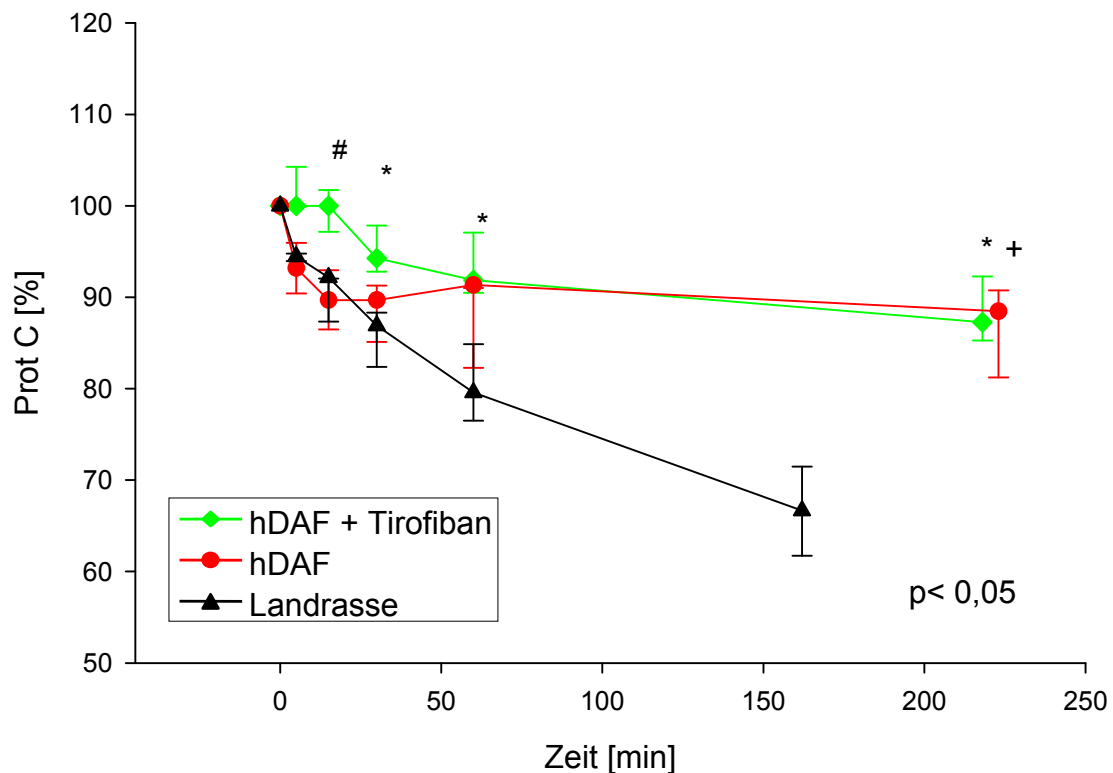
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	+
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	*
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	#

Abb.11: Antithrombin III – Verbrauch

### 3.a.8.1.3 Protein C

In der Gruppe der hDAF- transgenen Herzen ohne Tirofiban fällt die Konzentration zunächst ähnlich den Landrasseherzen auf  $89,7 \pm 7,9$  % stark ab, gleicht sich dann aber der Gruppe mit Tirofiban im Perfusat an. Signifikanter Unterschied zwischen Gruppe B und C bei 30 min.

Bei Perfusionsende ist der Unterschied beider Therapiegruppen zur Kontrolle signifikant.



Gruppe A (Landrasse ) vs. Gruppe B (hDAF)	+
Gruppe A (Landrasse ) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	*
Gruppe B (hDAF ) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	#

Abb. 3.a.12: Protein C- Verbrauch

#### 3.a.8.1.4 Thrombozytenverbrauch

In den Gruppen, die kein Tirofiban im Perfusat hatten, war der Abfall der Thrombozytenkonzentration besonders am Beginn der Perfusion höher als in der Tirofiban- Gruppe.

Nach 15 Minuten waren in Gruppe A nur noch  $60,14 \pm 11,6$  % der Ausgangskonzentration an Thrombozyten erhalten, während in Gruppe C noch  $98,61 \pm 6,5$  % vorhanden waren. Am Versuchsende fiel die Konzentration auf:

Gruppe A: auf  $50 \pm 12,2$  %.

Gruppe B: auf  $54,8 \pm 17,9$  %

Gruppe C: auf  $68,4 \pm 18,5$  %

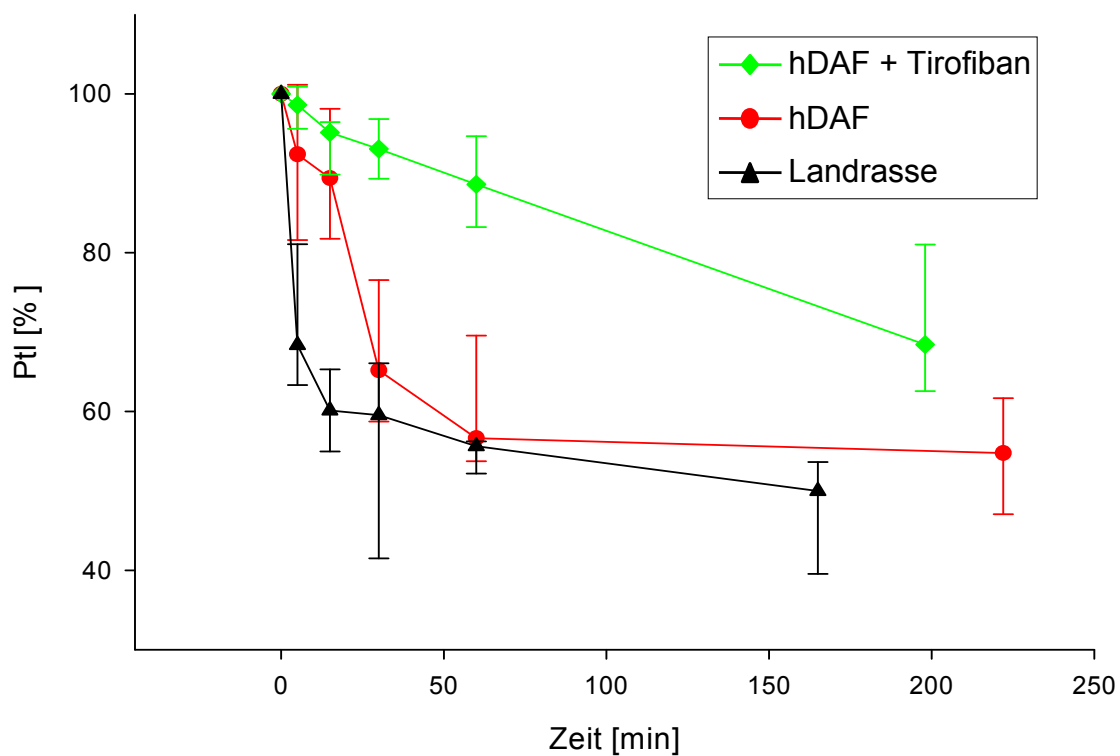


Abb. 3.a.13: Thrombozytenverbrauch

### 3.a.8.2 Creatininphosphokinase

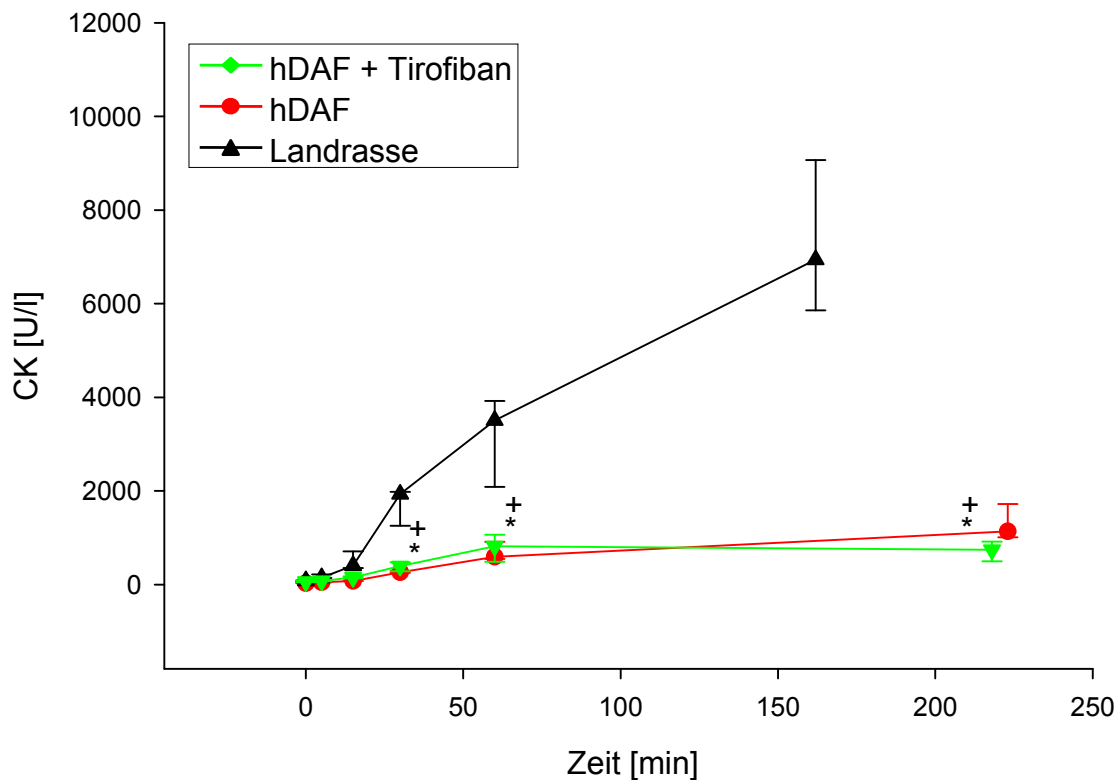
Die Creatininphosphokinase stieg in allen Gruppen an:

Gruppe A: von  $82 \pm 41$  U/l auf  $8705 \pm 2782$  U/l

Gruppe B: von  $68 \pm 24$  U/l auf  $1135 \pm 874$  U/l

Gruppe C: von  $63 \pm 36$  U/l auf  $840 \pm 474$  U/l

Der Unterschied zwischen den hDAF- transgenen und den Landrasseherzen war ab 30 Minuten Perfusionsdauer signifikant.



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	+
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	*
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe C (hDAF+ Tirofiban)	#

Abb.3.a.14: Creatininphosphokinase

### 3.a.9 Herzgewicht

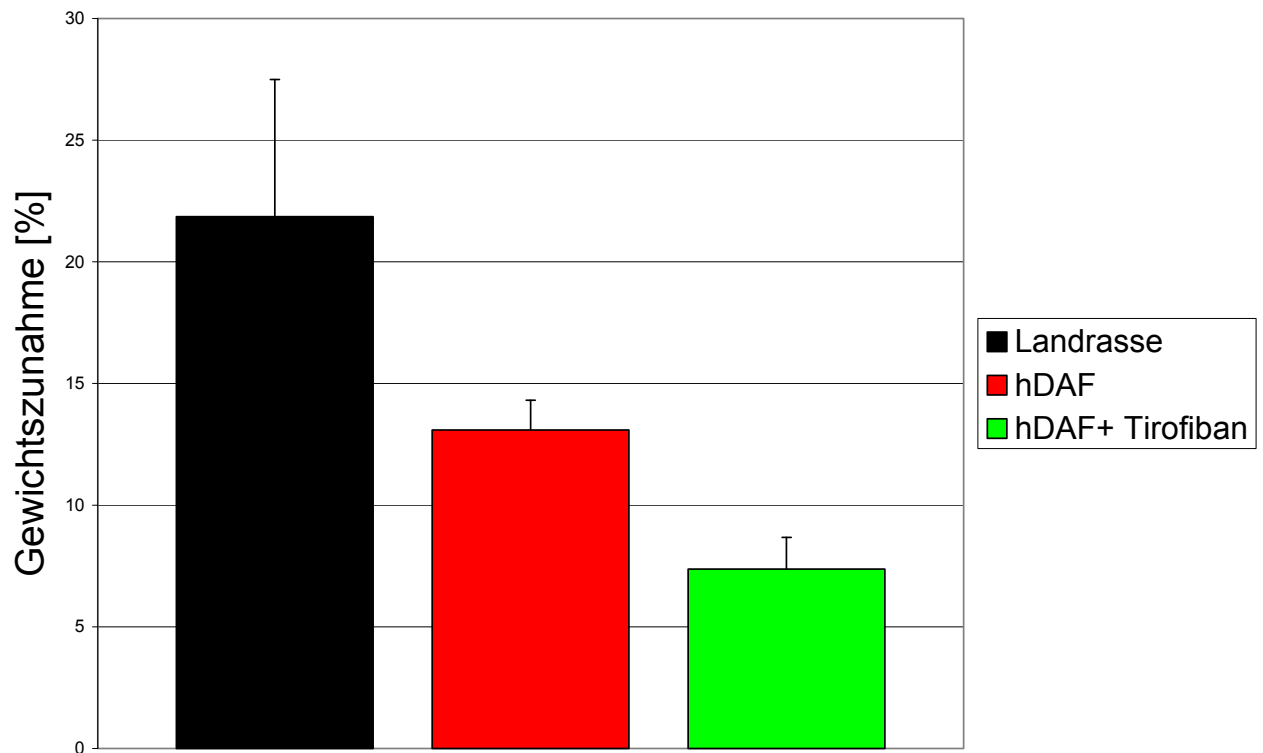


Abb. 3.a.15: Gewichtszunahme während der Perfusion

Die prozentuale Gewichtszunahme während der Perfusion betrug:

Gruppe A:  $21,9 \pm 5,7$  %

Gruppe B:  $13,1 \pm 1,2$  %

Gruppe C:  $7,4 \pm 1,3$  %.

### 3.a.10 Perfusionsdauer

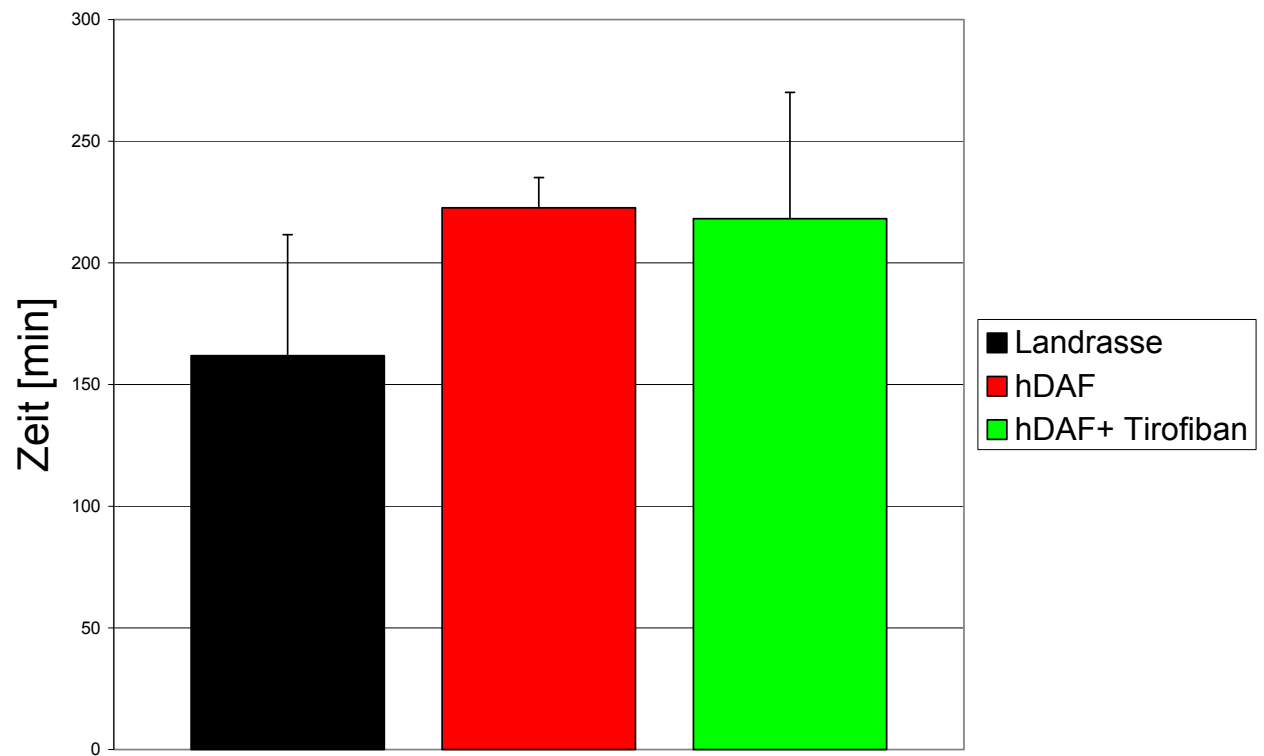
Die Perfusionsdauer der Landrasseherzen war deutlich geringer. Die zusätzliche Gabe von Tirofiban hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Perfusionsdauer. Die Herzen konnten die Nachlast für folgenden Zeiten überwinden:

Gruppe A:  $162 \pm 121$  Minuten

Gruppe B:  $223 \pm 30$  Minuten

Gruppe C:  $218 \pm 115$  Minuten

Durch die recht großen Abweichungen bedingt, waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant.



*Abb. 3.a.16: Perfusionsdauer*

### 3.b Beeinflussung der hyperakuten Abstoßungsreaktion durch

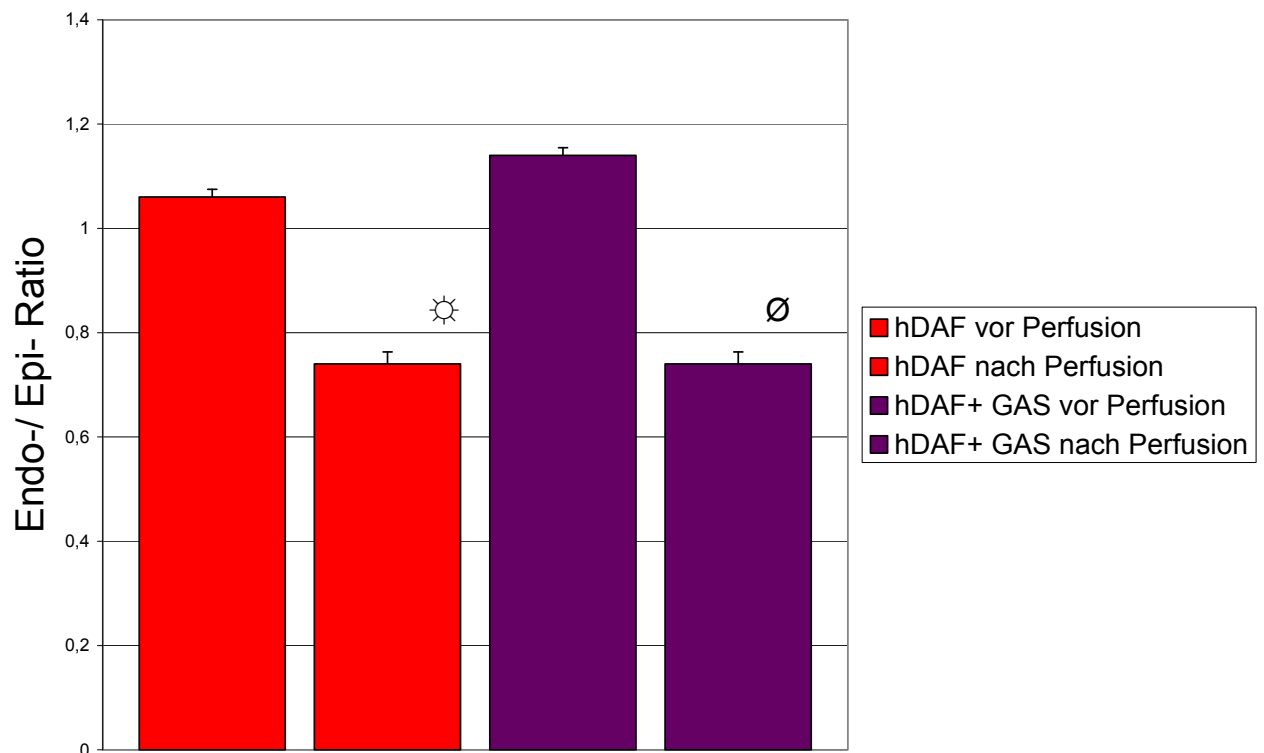
#### hDAF+ GAS 914

Im Teil B der Arbeit werden die hDAF- transgenen (Gruppe B) Herzen mit den hDAF- transgenen Herzen, die zusätzlich noch GAS 914 erhalten haben (Gruppe D), verglichen. Als Kontrolle dienen erneut die Landrasseherzen (Gruppe A).

Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	×
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	⊖
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

### 3.b.1 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung im gesamten linken Ventrikel

In Gruppe B (hDAF) fiel die EER von  $1,06 \pm 0,29$  auf  $0,74 \pm 0,45$  bei Perfusionsende ab. Der Abfall war in Gruppe D von  $1,14 \pm 0,33$  auf  $0,8 \pm 0,36$  im Verhältnis ähnlich, wenn man den etwas höheren Ausgangswert in Gruppe D (hDAF+ GAS 914) berücksichtigt. In beiden Gruppen war der Abfall statistisch signifikant.



Signifikanz Gruppe B vor/ nach Perfusion	⊙
Signifikanz Gruppe D vor/ nach Perfusion	∅

Abb. 3.b.1: Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung im gesamten linken Ventrikel  
(Signifikanz vor vs: nach Perfusion)



### 3.b.2 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF- transgenen Herzen

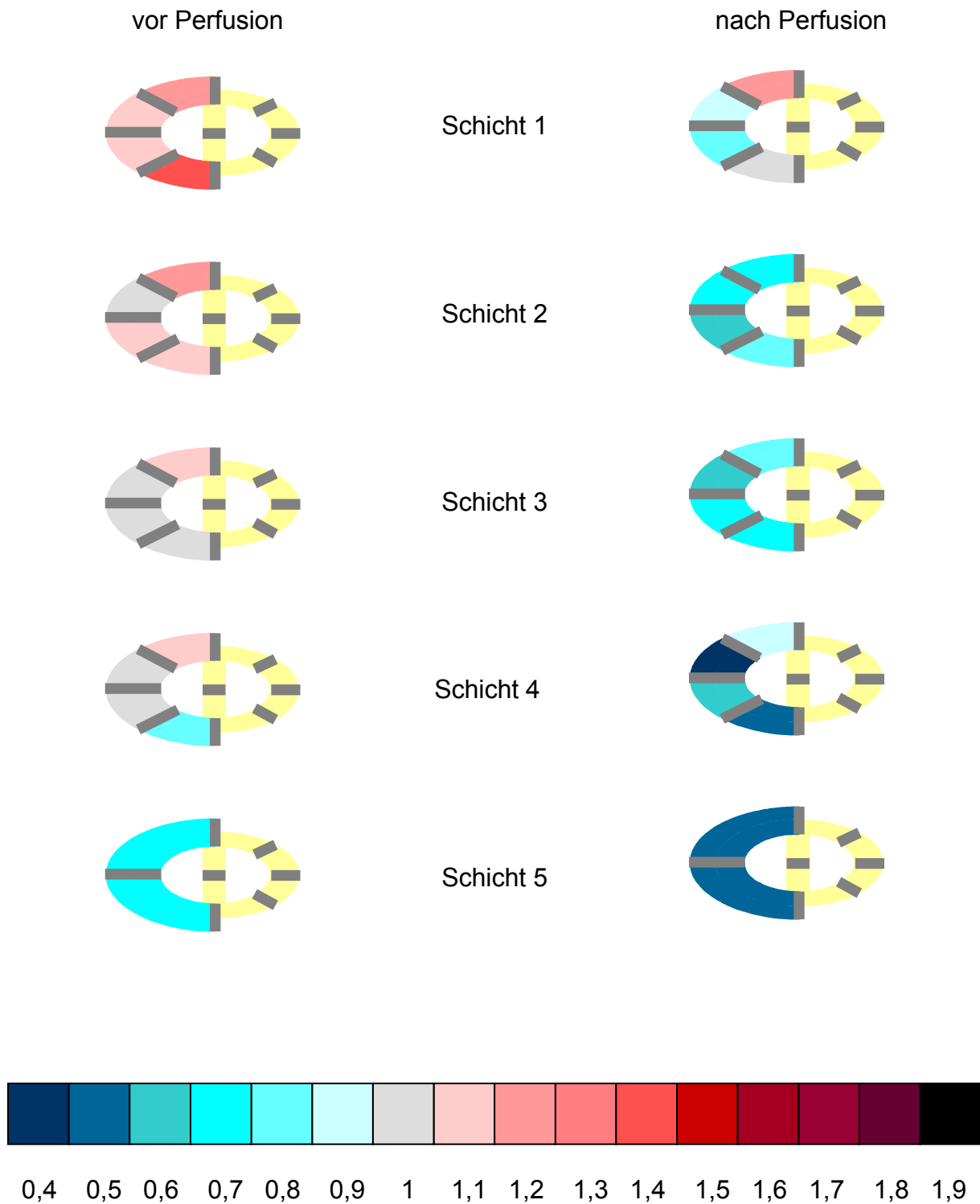
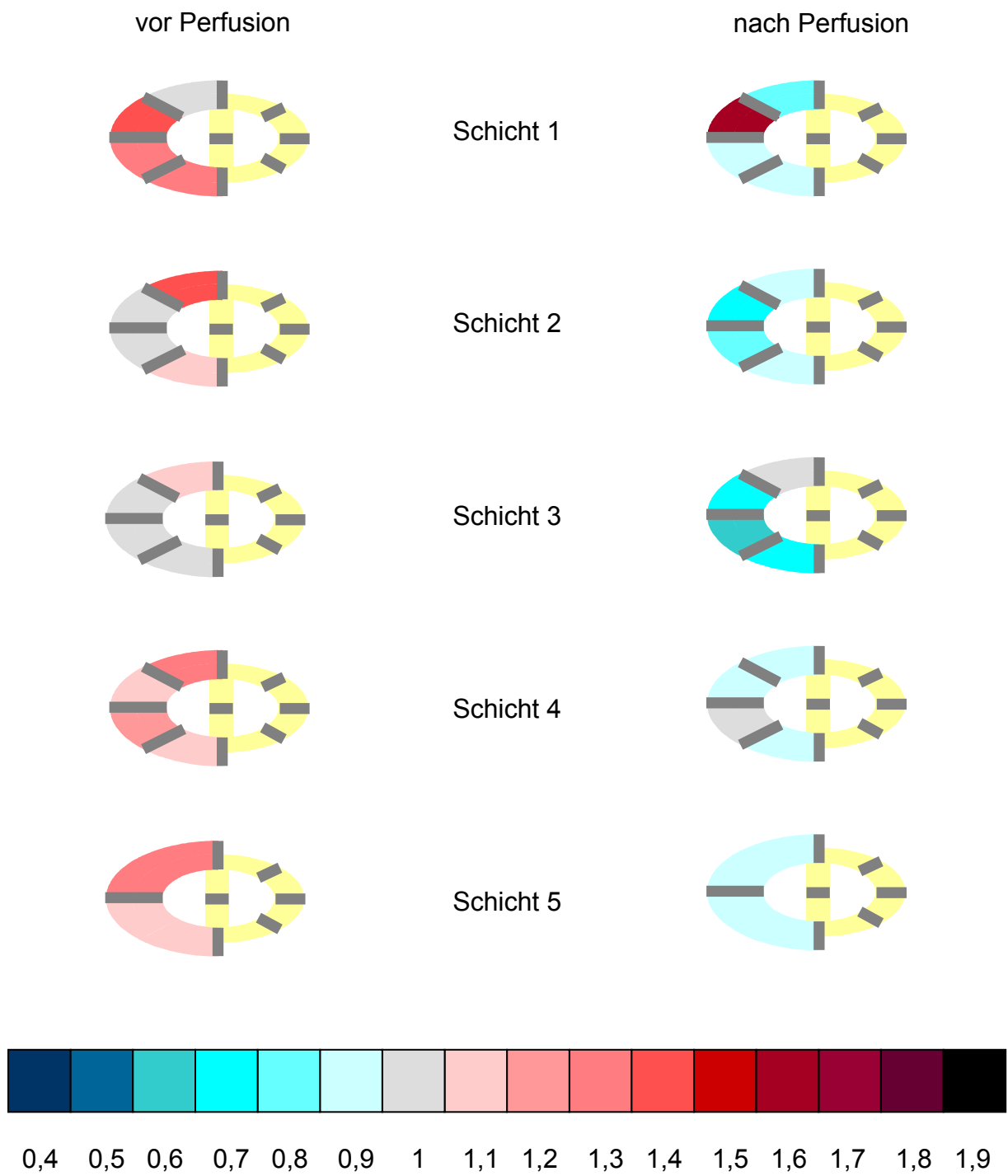


Abb. 3.b.2: Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF- transgenen Herzen

Bei den transgenen Herzen (Gruppe B) war vor Xenoperfusion mit einem Verhältnis von 0,7 nur in Schicht fünf ein wesentlicher Unterschied zum restlichen Herzen mit einem mittleren Verhältnis von  $1,06 \pm 0,29$  zu verzeichnen. Am Perfusionsende fiel das Verhältnis dann auf  $0,74 \pm 0,45$  ab. Auch in Schicht fünf nahm das Verhältnis auf 0,5 ab. Ein nicht signifikanter Trend zum Abfall der EER von  $0,95 \pm 0,49$  basal (Schicht1) auf eine EER von  $0,46 \pm 0,45$  apikal (Schicht 5) war bei Abstoßung zu verzeichnen.

### **3.b.3 Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF- transgenen Herzen mit GAS 914**

Die EER fiel relativ homogen von  $1,14 \pm 0,33$  auf  $0,8 \pm 0,36$  ab. Es fand keine wesentliche Veränderung der endo-/ epikardialen Mikrosphärenverteilung im Vergleich zu Gruppe B statt. Lediglich in Schicht 1 gab es ein Segment, in dem die EER nach Perfusion nicht abfiel. In der Mikrosphärenverteilung von apikal nach basal gab es nur geringe Unterschiede mit einem etwas geringeren Abfall der endo-/ epikardialen Mikrosphärenverteilung apikal im Vergleich zu den basalen Schichten.



*Abb.3.b.3: Endo-/ Epikardiale Mikrosphärenverteilung der hDAF- transgenen Herzen mit GAS 914*

### 3.b.4 Arterio- Venöse Sauerstoffdifferenz

Die AVDO<sub>2</sub> stieg in Gruppe D deutlich geringer an als in den Gruppen A und B. Sie erreichte nach 15 Minuten Perfusionsdauer ein Maximum von  $2,3 \pm 0,9$  ml O<sub>2</sub>/ 100 ml Blut. Gruppe A:  $6,1 \pm 4,7$  ml O<sub>2</sub>/ 100 ml Blut nach 15 Minuten, Gruppe B:  $4,4 \pm 1,9$  ml O<sub>2</sub>/ 100 ml Blut nach 15 Minuten.

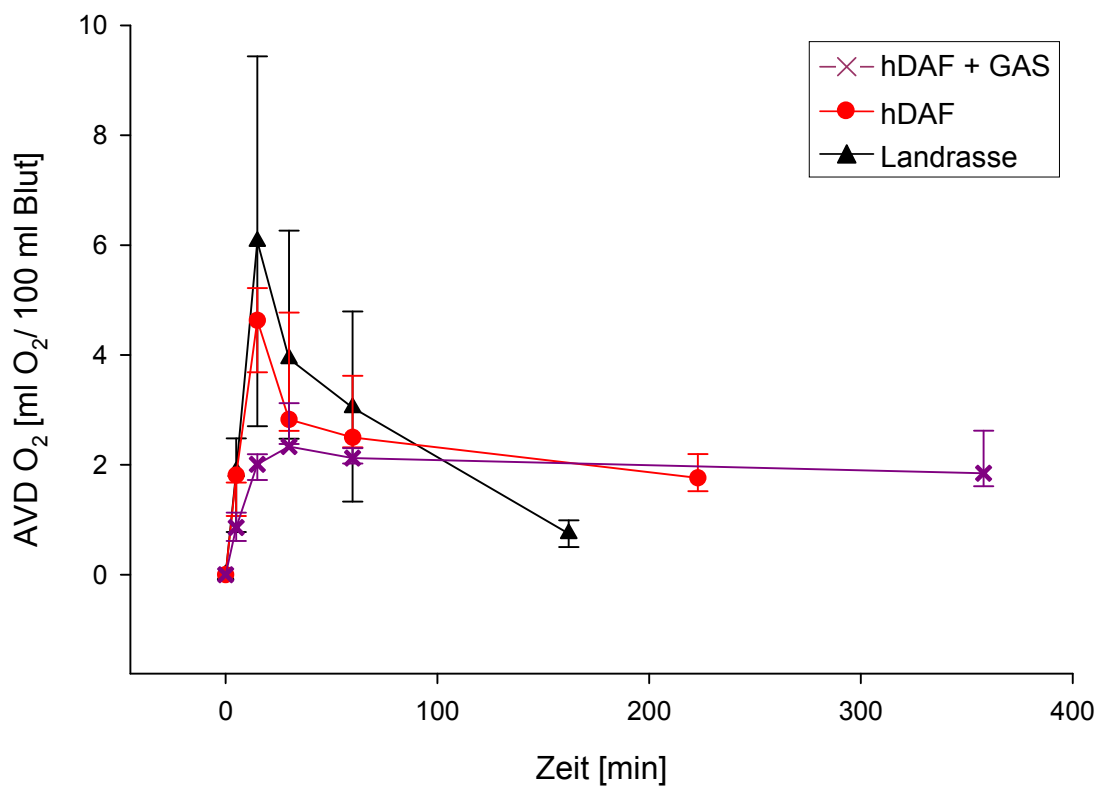


Abb. 3.b.4: Arterio-/ venöse Sauerstoffdifferenz

### 3.b.5 Schlagarbeitsindex

Der Schlagarbeitsindex stieg in Gruppe D nach 30 Minuten auf  $2729 \pm 1064$  ergs/ s an. Gruppe A erreichte nach 15 Minuten mit  $1460 \pm 285$  ergs/ s die schlechteste Pumpfunktion und Gruppe B lag mit  $2508 \pm 1644$  ergs/ s zwischen den beiden anderen Gruppen.

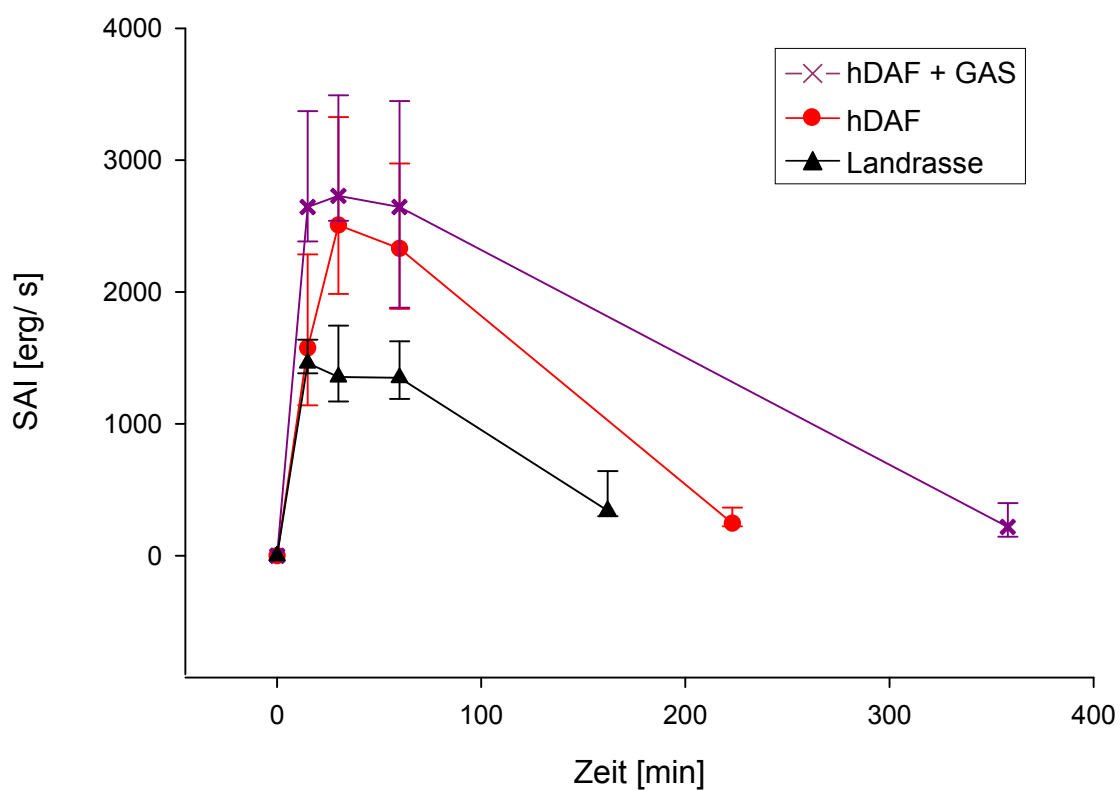


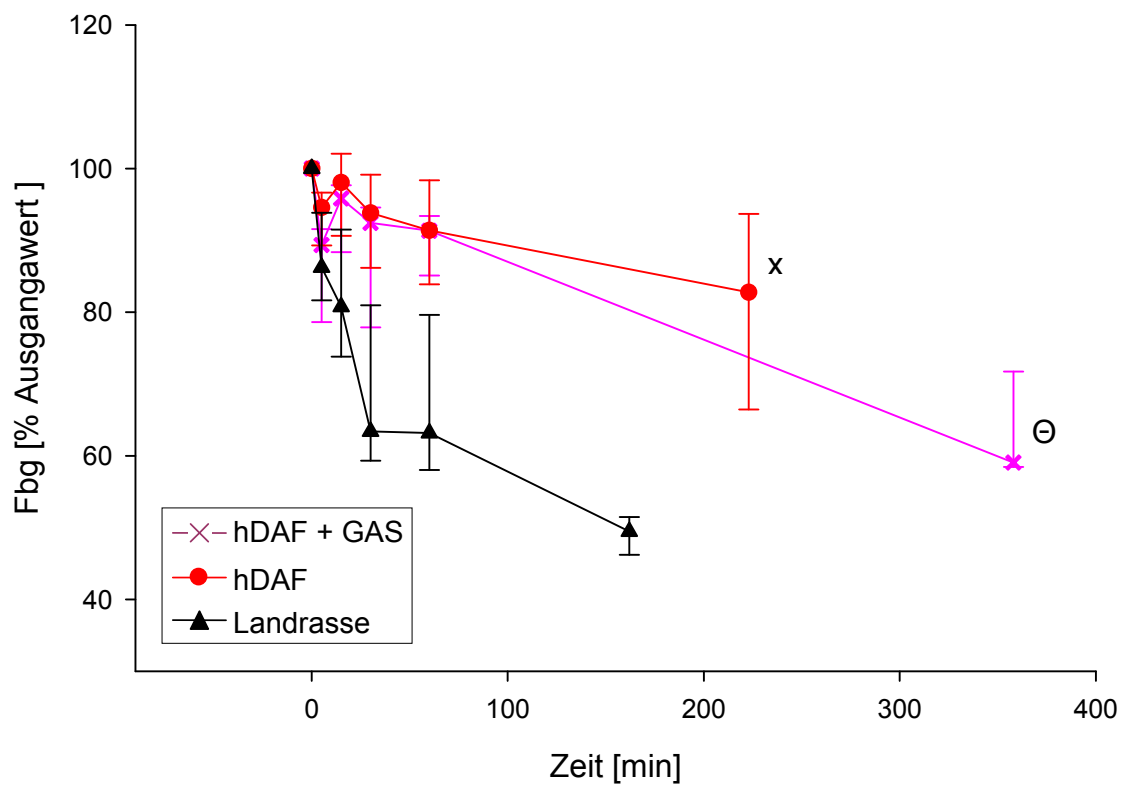
Abb. 3.b.5: Schlagarbeitsindex

### 3.b.6 Laboruntersuchungen

#### 3.b.6.1 Gerinnungsparameter

##### 3.b.6.1.1 Fibrinogen

Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied im Fibrinogenverbrauch zwischen den Gruppen A und D bis 60 Minuten, dann war der Abfall in Gruppe D auf  $59 \pm 15$  % im Vergleich zu  $83 \pm 30$  % in Gruppe B bei Perfusionsende stärker. In Gruppe A zeigte sich ein von Beginn an stärkerer Abfall auf  $49 \pm 5$  %.



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	×
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	⊖
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

Abb. 3.b.6: Fibrinogenverbrauch

### 3.b.6.1.2 Thrombozytenverbrauch

Es traten keine wesentlichen Unterschiede im Thrombozytenverbrauch zwischen den Gruppen auf.

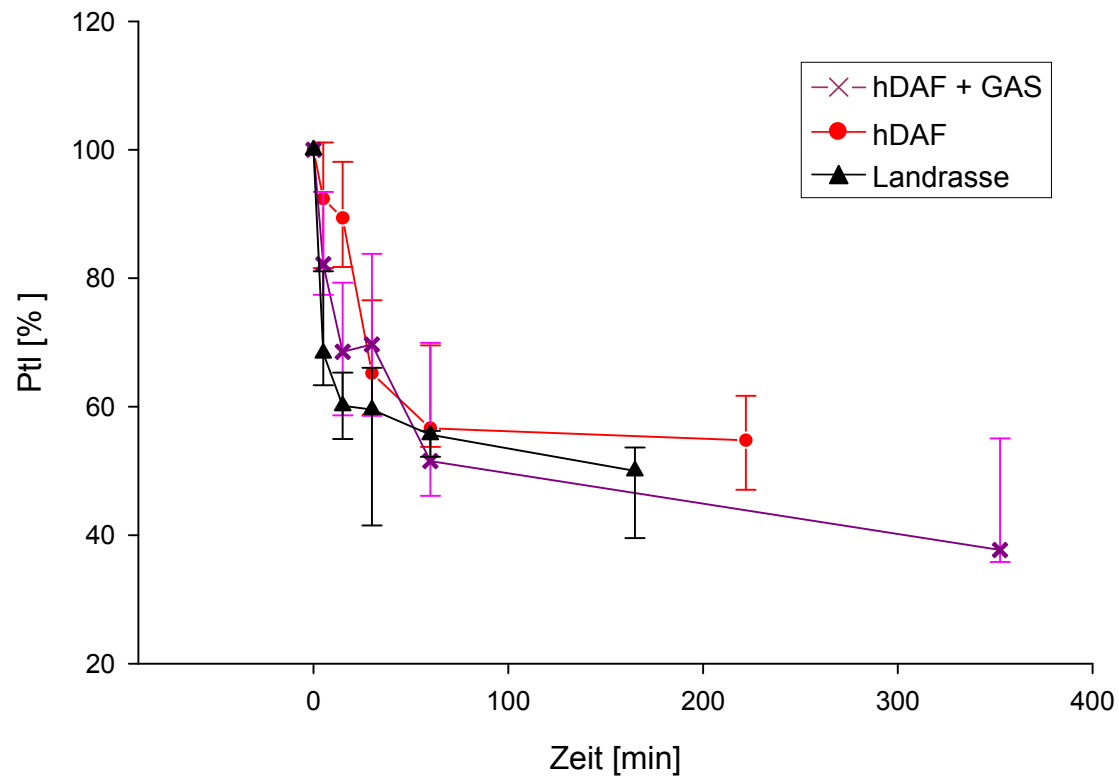


Abb. 3.b.7: Thrombozytenverbrauch

### 3.b.7 Herzenzyme

#### 3.b.7.1 Creatininphosphokinase

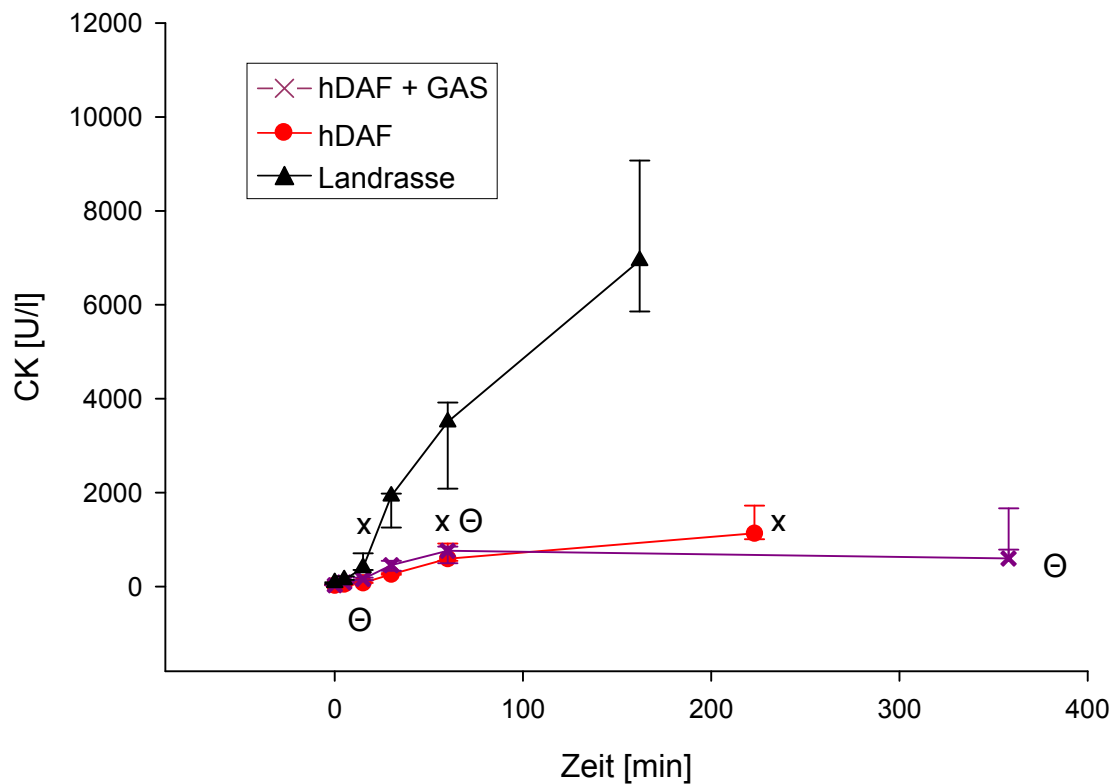
Die CK stieg in Gruppe A deutlich stärker an als in den anderen Gruppen. Zum Perfusionsende war der Anstieg in Gruppe D am niedrigsten.

Gruppe A: von  $82 \pm 41$  U/l auf  $8705 \pm 2782$  U/l

Gruppe B: von  $68 \pm 24$  U/l auf  $2375 \pm 874$  U/l

Gruppe D: von  $35 \pm 18$  U/l auf  $2245 \pm 984$  U/l

Ab 30 Minuten waren die Unterschiede gegenüber Gruppe A statistisch signifikant.



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	x
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	Θ
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

Abb. 3.b.8: Creatininphosphokinase



### 3.b.7.2 Creatininphosphokinase- MB

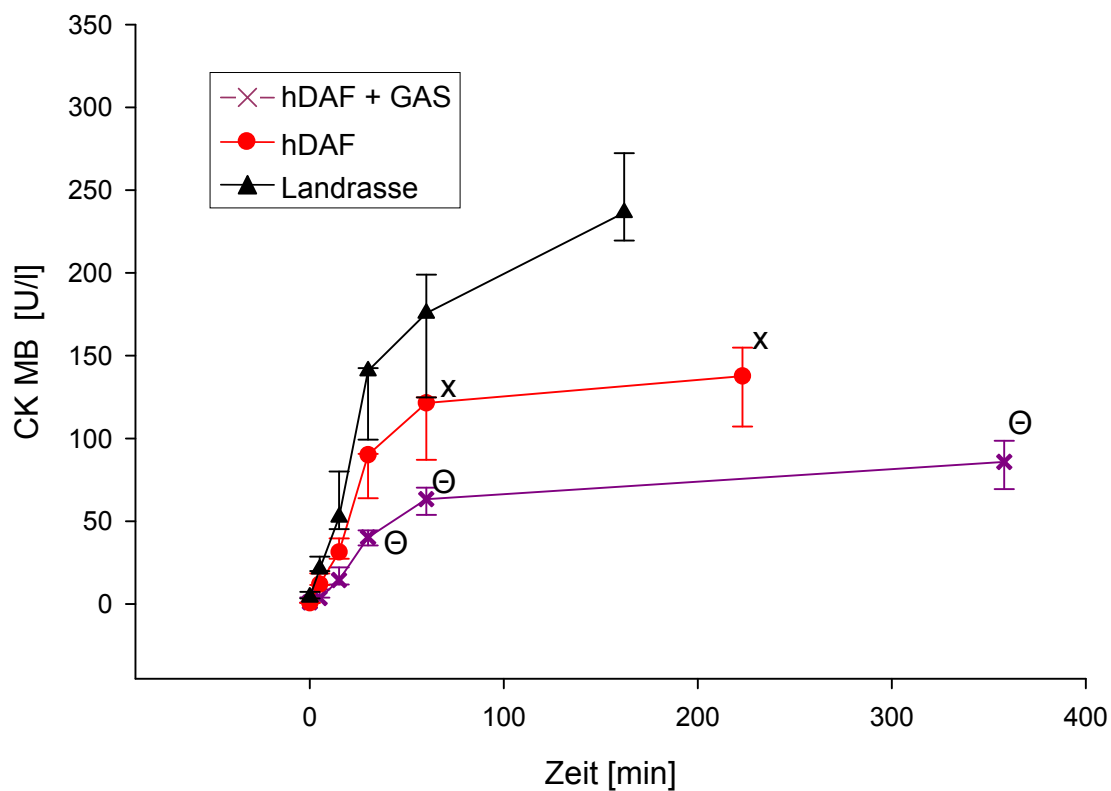
Auch die CK MB stieg bei den Landrasseherzen deutlich stärker an. Durch die Gabe von Gas 914 konnte der Anstieg von CK MB zusätzlich verringert werden.

Gruppe A: von  $4,2 \pm 4,8$  U/l auf  $236 \pm 45$  U/l

Gruppe B: von  $2,7 \pm 0,2$  U/l auf  $137 \pm 47$  U/l

Gruppe D: von  $5,7 \pm 3,7$  U/l auf  $86 \pm 35$  U/l.

Die Unterschiede waren für Gruppe D ab 15 Minuten und für Gruppe B ab 30 Minuten gegenüber Gruppe A signifikant.



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAf)	×
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	Θ
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

Abb.3.b.9: Creatininphosphokinase- MB

### 3.b.7.3 Glutamat- Oxalacetat- Transaminase

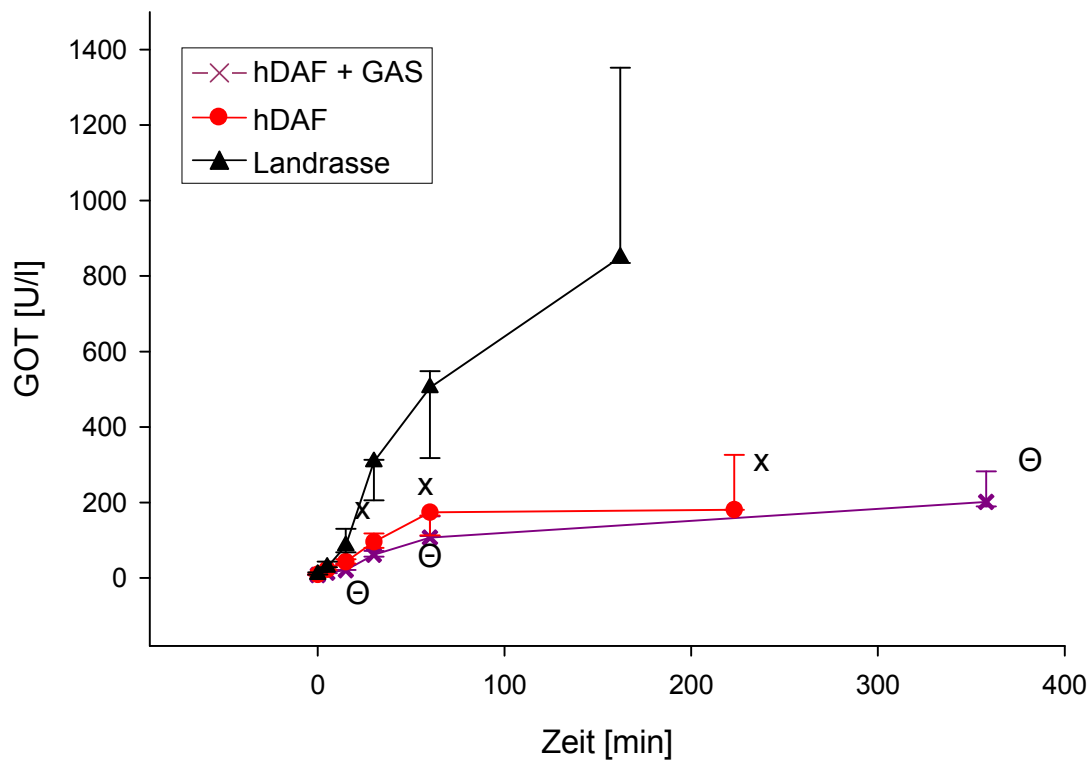
Der Anstieg der GOT war bei Beginn der Perfusion in Gruppe D am geringsten, gleichte sich aber bei Perfusionsende Gruppe B an. Die GOT Konzentration war bei den Landrasseherzen von Anfang an deutlich höher.

Gruppe A: von  $9,5 \pm 7,2$  U/l auf  $850 \pm 447$  U/l

Gruppe B: von  $9,5 \pm 2,4$  U/l auf  $181 \pm 162$  U/l

Gruppe D: von  $8,0 \pm 3,1$  U/l auf  $201 \pm 113$  U/l.

Die Unterschiede von Gruppe B und D waren ab 30 Minuten gegenüber Gruppe A signifikant.

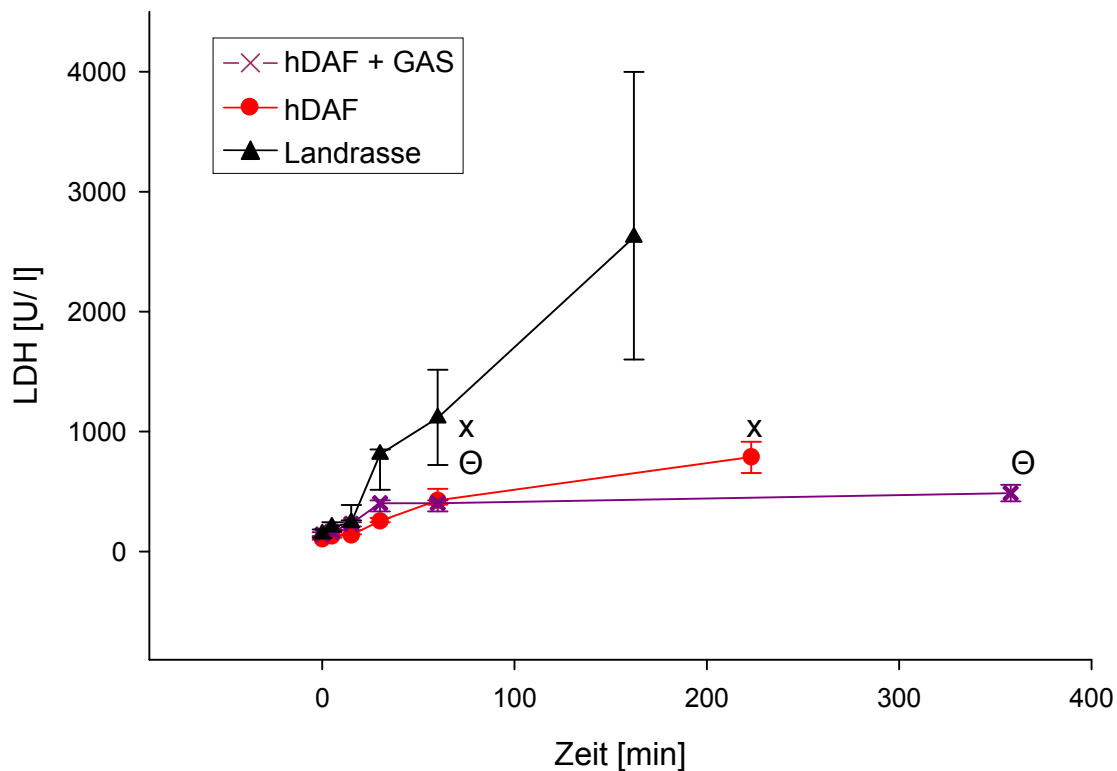


Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	×
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	⊖
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

Abb.3.b.10: Glutamat- Oxalacetat- Transaminase

### 3.b.7.4 Laktatdehydrogenase

Die LDH Konzentration stieg in Gruppe B und D zunächst ähnlich an. Bei Perfusionsende war der Anstieg in Gruppe D geringer. Bei den Landrasseherzen stieg die LDH von Beginn an deutlich stärker an. Gruppe A von  $147 \pm 84$  U/ l auf  $2620 \pm 2075$  U/ l; in Gruppe B: von  $106 \pm 29$  U/ l auf  $790 \pm 319$  U/ l und in Gruppe D: von  $143 \pm 38$  U/ l auf  $703 \pm 495$  U/ l. Die Unterschiede waren ab 60 Minuten gegenüber Gruppe A signifikant.



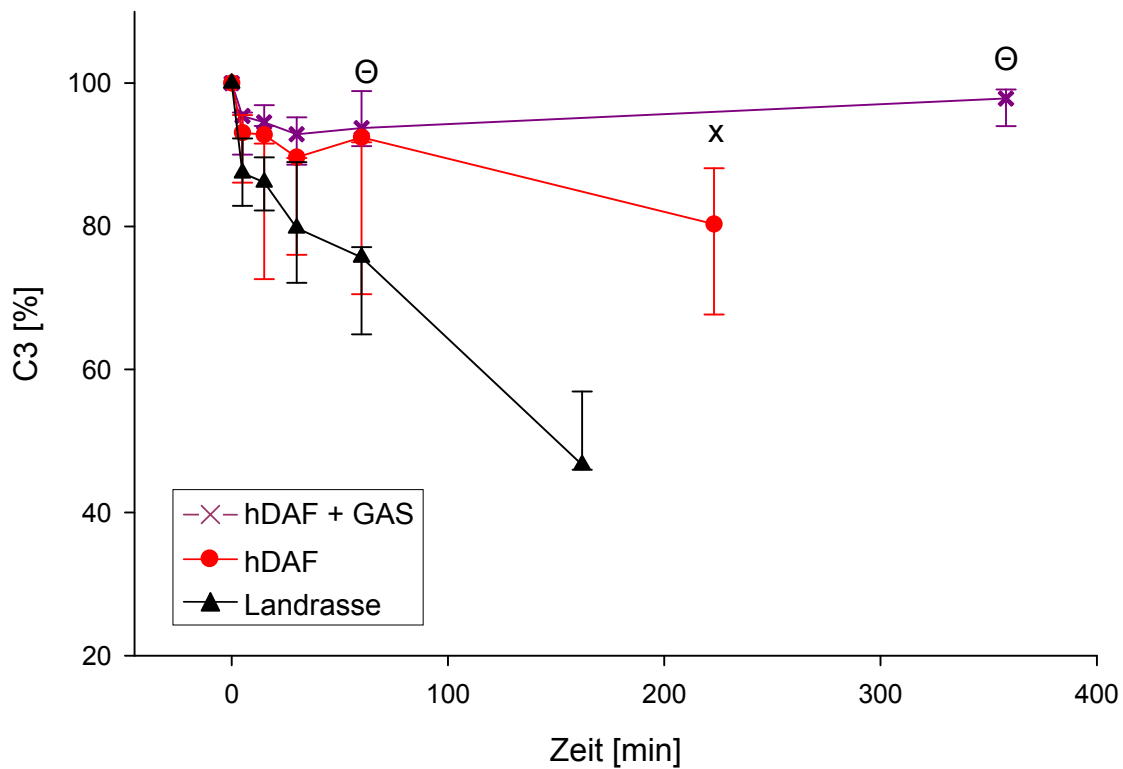
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	x
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	Θ
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

Abb.3.b.11: Laktatdehydrogenase

### 3.b.8 Komplement

#### 3.b.8.1 Komplementfaktor C3 prozentual

Die Konzentration von C 3 prozentual im Perfusat fiel in Gruppe A auf  $46,7 \pm 9,4 \%$  des Ausgangswertes am stärksten ab.



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	x
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	Θ
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

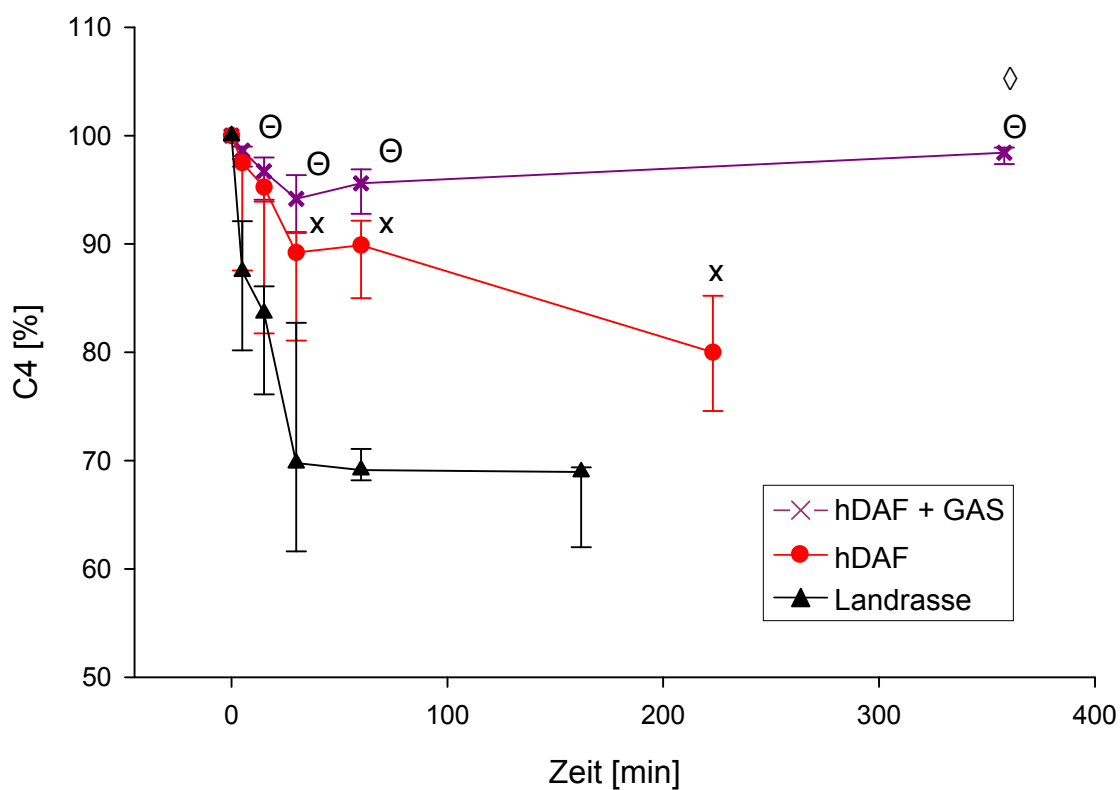
Abb. 3.b.12: Komplementfaktor C3 prozentual

In Gruppe B verringerte sich die Konzentration zunächst auf  $89,7 \pm 16,5 \%$  und fiel bis zum Perfusionsende weiter auf  $80,3 \pm 22,9 \%$  ab. Der Unterschied zu Gruppe A war bei Perfusionsende statistisch signifikant.

In Gruppe D war zunächst ein Abfall auf  $92,9 \pm 8,1$  % zu verzeichnen, danach stieg die Konzentration sogar leicht auf  $97,9 \pm 6,2$  % an. Die Differenz zu Gruppe A war bei 60 Minuten und am Perfusionsende statistisch signifikant.

### 3.b.8.2 Komplementfaktor C4 prozentual

In Gruppe A war der Abfall der Konzentration des Komplementfaktors C 4 im Perfusat mit  $71,7 \pm 2,9$  nach 60 Minuten und  $69,4 \pm 6,4$  % bei Versuchsende am deutlichsten.



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	x
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	Θ
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

Abb. 3.b.12: Komplementfaktor C4 prozentual

In Gruppe B nahm die Konzentration nach 60 Minuten auf  $94,4 \pm 7,2$  % ab und fiel bis zum Perfusionsende auf  $82,6 \pm 11,9$  %.

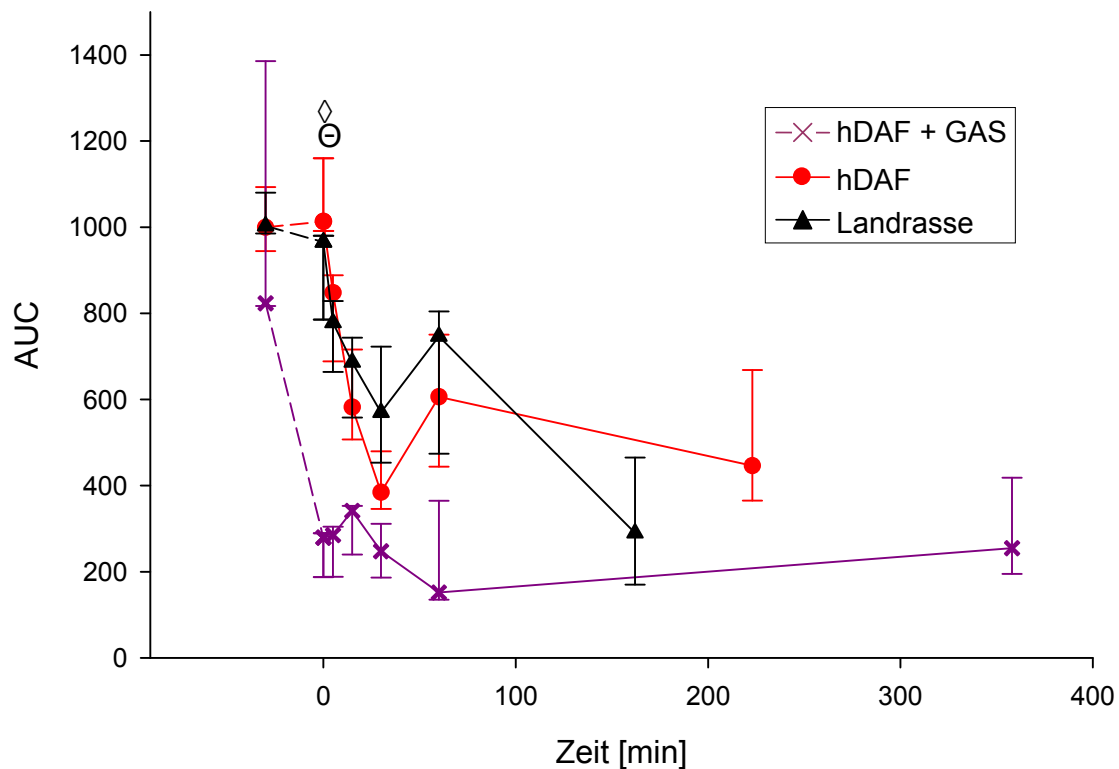
In Gruppe D fiel die Konzentration auf  $95,6 \pm 5,0$  % nach 60 Minuten und stieg bis zum Perfusionsende wieder leicht auf  $98,4 \pm 1,9$  % an.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen A und B waren ab 30 Minuten, die zwischen A und D ab 15 Minuten und die zwischen B und D bei Abstoßung statistisch signifikant.

### 3.b.9 Antikörper

#### 3.b.9.1 Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgG Antikörper

Durch die Gabe von Gas 914 vor Perfusionsbeginn in Gruppe D wurde der Gehalt an Antikörpern von  $823 \pm 696$  AUC auf  $279 \pm 125$  AUC gesenkt. In Gruppe B stieg der Antikörperspiegel bis zum Perfusionsbeginn minimal von  $1000 \pm 182$  AUC auf  $1013 \pm 206$  AUC an.



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	×
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	Θ
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

Abb. 3.b.13 Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgG

In Gruppe A fiel er von  $1033 \pm 116$  AUC auf  $965 \pm 238$  AUC leicht ab. In Gruppe D sank die Konzentration während der Perfusion nur noch leicht auf  $152 \pm 256$  AUC nach 60 Minuten ab. In den anderen Gruppen verringerten sich bis 30 Minuten die Spiegel kontinuierlich, stiegen nach einer Stunde wieder leicht an und fielen bis zum

Perfusionsende erneut ab. Die Unterschiede waren zu Perfusionsbeginn zwischen Gruppe D und den beiden anderen Gruppen signifikant.

### 3.b.9.2 Immunglobuline G gesamt

Bei der Gesamtmenge der Immunglobuline G zeigte sich in allen Gruppen ein Konzentrationsabfall zwischen der Konzentration beim Blutspender und im befüllten Perfusionssystem nach Verdünnung mit Vollelektrolytlösung vor Beginn der Perfusion. Nach Perfusionsbeginn war kein wesentlicher Abfall der IgG Konzentration mehr zu verzeichnen

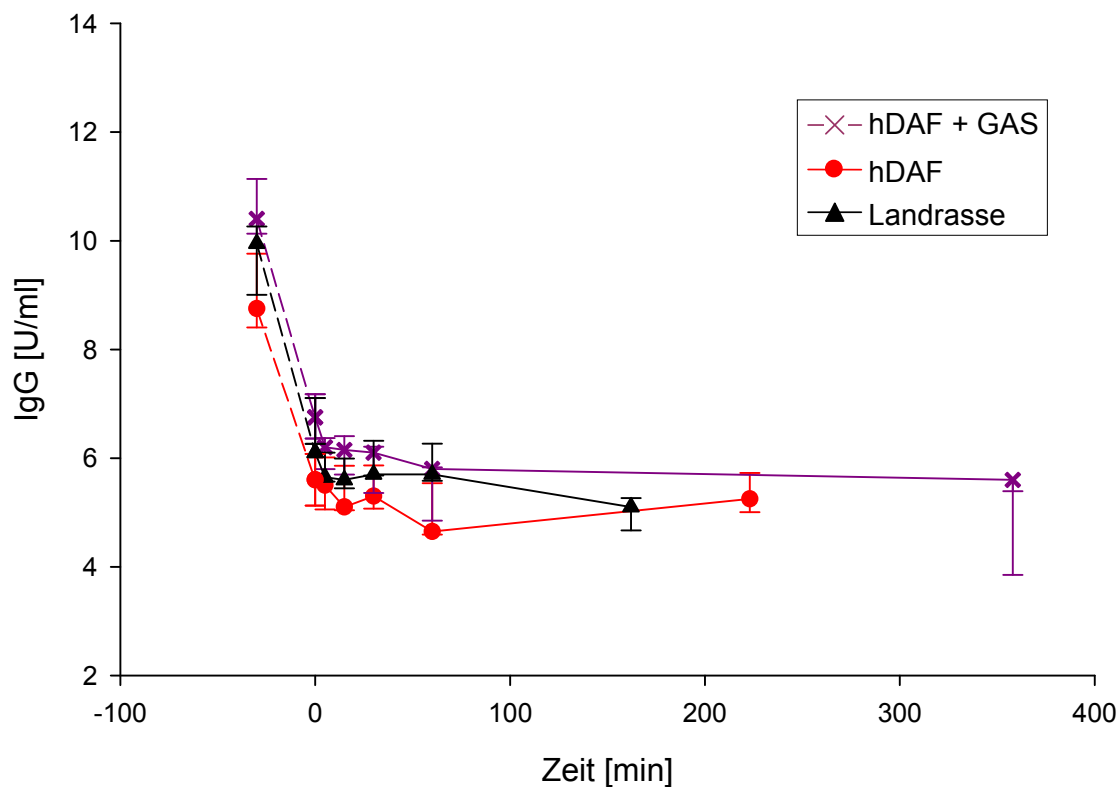
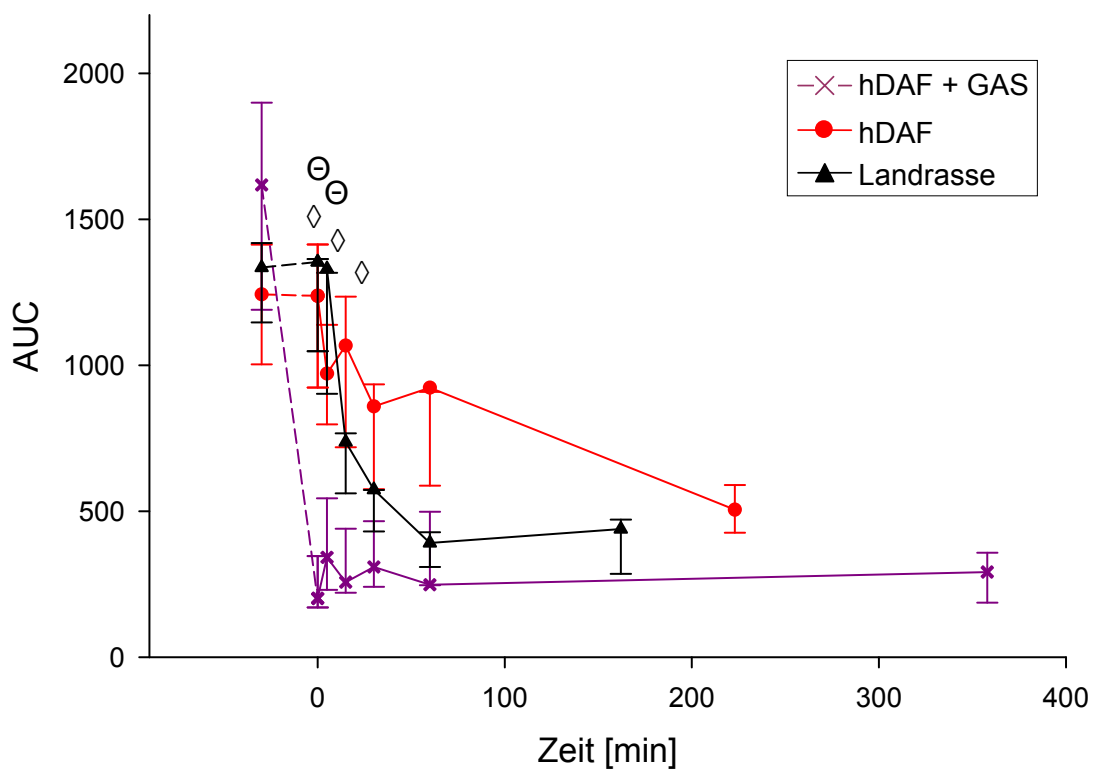


Abb. 3.b.14: Immunglobuline G gesamt



### 3.b.9.3 Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgM Antikörper

Ähnlich den Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgG Antikörpern fielen die Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgM Antikörper in Gruppe D von  $2096 \pm 557$  AUC beim Blutspender auf  $201 \pm 215$  nach Applikation von GAS 914 ab. In Gruppe A blieb die Konzentration mit  $1334 \pm 333$  AUC und  $1354 \pm 386$  AUC im selben Zeitraum fast konstant, fiel dann aber während der Xenoperfusion kontinuierlich ab (15 min:  $737 \pm 252$  AUC; 60 min.:  $453 \pm 118$ ).



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	×
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	⊖
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

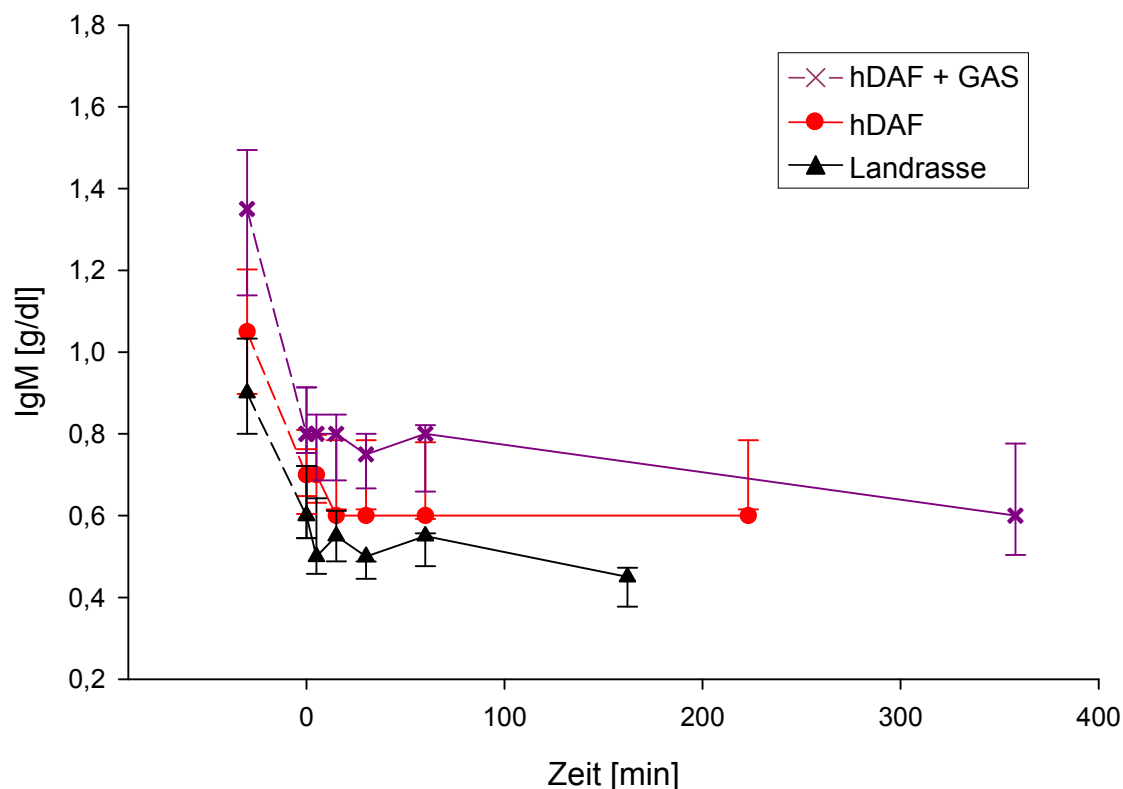
Abb.3.b.15: Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgM

In Gruppe B war ebenso fast keine Veränderung zwischen der Konzentration bis zum Perfusionsbeginn zu verzeichnen: Der AUC- Wert lag bei  $1432 \pm 358$  beim Blutspender und  $1184 \pm 483$  bei Perfusionsbeginn, danach fiel der Wert auf  $930 \pm$

359 nach 60 min. Perfusionszeit und  $565 \pm 182$  bei der Abstoßung des Grafts. Die Unterschiede zwischen Gruppe A und D waren bei Perfusionsbeginn und nach 5 min. Perfusionsdauer, ebenso wie zwischen B und D zu Perfusionsbeginn, nach 5 und 15 min. Perfusionsdauer, statistisch signifikant.

### 3.b.9.4 Immunglobuline M gesamt

In allen Gruppen war ein Konzentrationsabfall der Gesamtmenge der IgM Antikörper vom Blutspender zum befüllten Perfusionssystem zu verzeichnen. Gruppe A: von  $0,9 \pm 2,8$  g/ dl auf  $0,6 \pm 0,2$  g/dl, Gruppe B: von  $1,1 \pm 0,4$  g/dl auf  $0,7 \pm 0,2$  g/dl und Gruppe D: von  $1,3 \pm 0,4$  g/dl auf  $0,7 \pm 0,2$ .

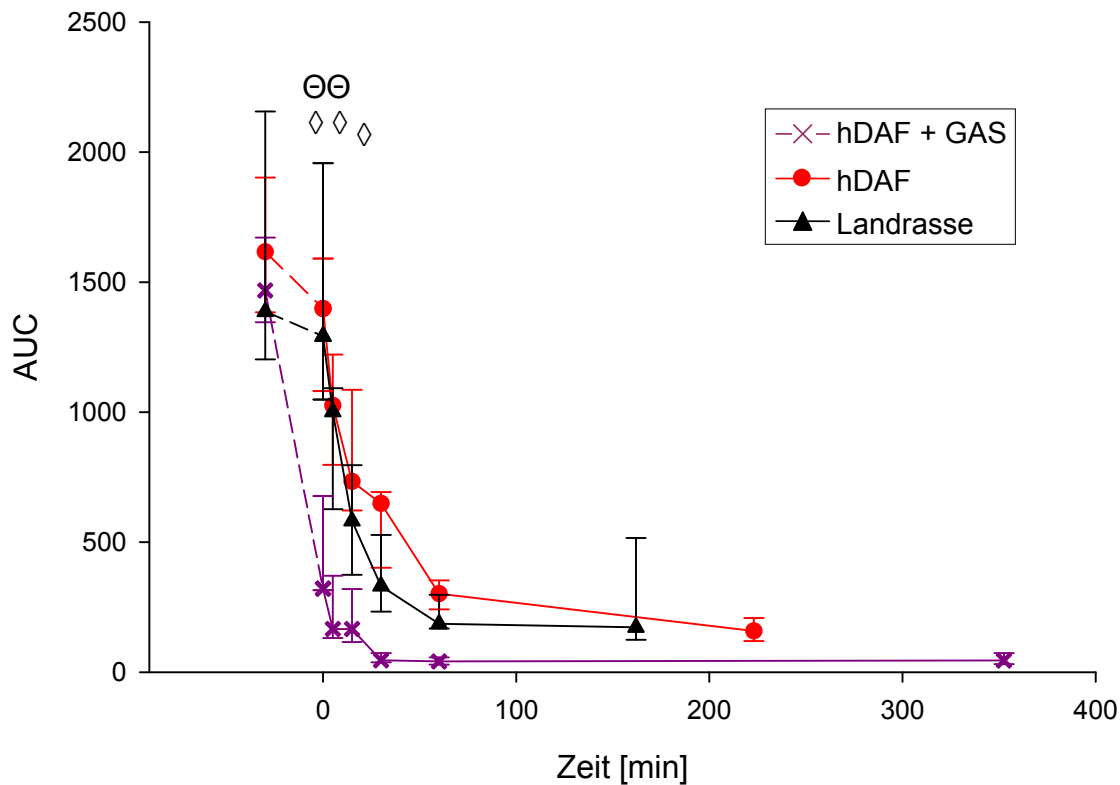


### 3.b.16: Immunglobuline M gesamt

Nach Perfusionsbeginn trat in allen Gruppen nur noch eine leichte Verringerung der IgM Antikörperkonzentration auf. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

### 3.b.9.5 Anti- Schwein- hämolytische Antikörper (APA)

Die APA fielen in Gruppe D ähnlich wie die Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgG und IgM Antikörper nach der Gabe von GAS 914 von 1467 AUC auf 320 AUC ab. Danach war in dieser Gruppe noch ein Abfall auf 60 AUC am Perfusionsende zu verzeichnen.



Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe B (hDAF)	×
Gruppe A (Landrasse) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	Θ
Gruppe B (hDAF) vs. Gruppe D (hDAF + GAS 914)	◇

Abb.3.17: Anti- Schwein- hämolytische Antikörper

In den beiden anderen Gruppen fiel die APA Konzentration nach Hinzufügen von GAS 914 ins Perfusat im selben Zeitraum viel geringer ab, von 1396 AUC auf 1296 AUC in Gruppe A und von 1616 AUC auf 1397 AUC in Gruppe B.

Während der Perfusion ging die Antikörperkonzentration in beiden Gruppen ohne GAS 914 kontinuierlich zurück: (Gruppe A: 15 Min.: 582 AUC, 60 Min: 186 AUC, bei Abstoßung: 182 AUC; Gruppe B: 15 Min: 732 AUC, 60 Min: 302 AUC, bei Abstoßung: 158). Die Unterschiede waren in Gruppe A zu Perfusionsbeginn und nach 5 Minuten und in Gruppe B zusätzlich noch nach 15 Minuten gegenüber Gruppe D statistisch signifikant.

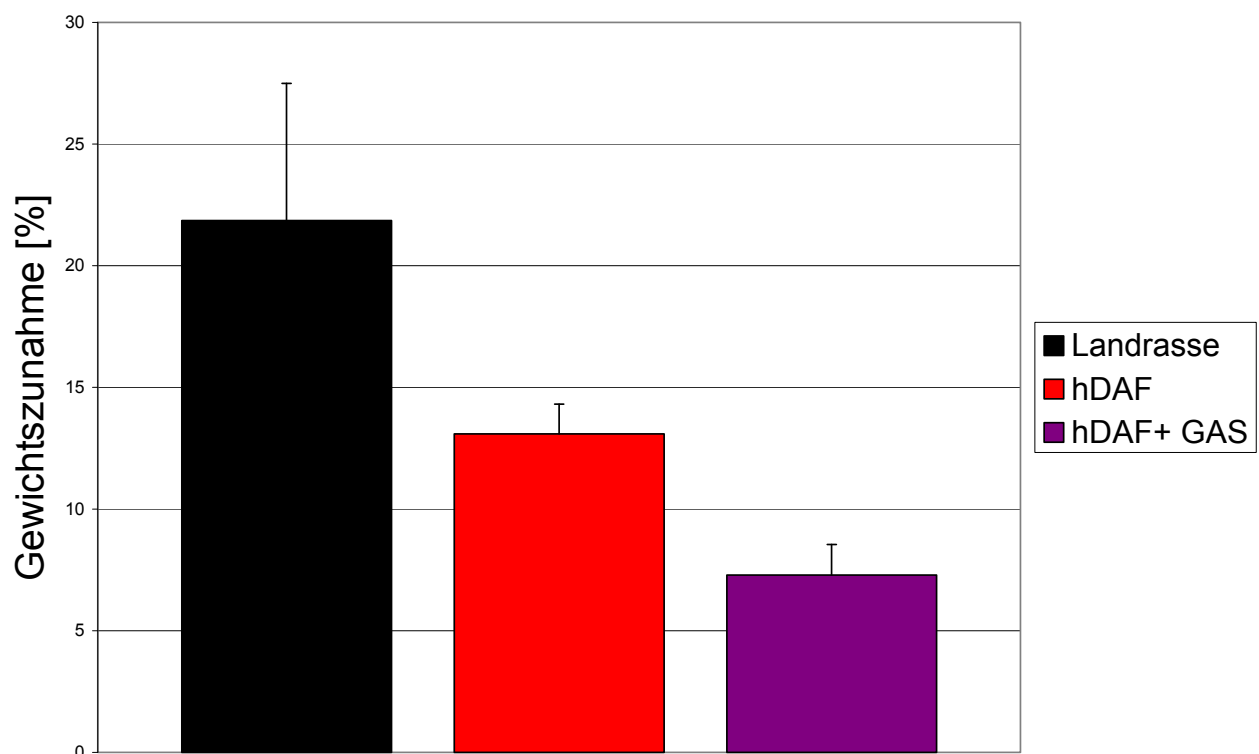
### 3.b.10 Herzgewicht

Die durchschnittliche Gewichtszunahme betrug in:

Gruppe A:  $21,9 \pm 5,7 \%$ .

Gruppe B:  $13,1 \pm 1,2 \%$

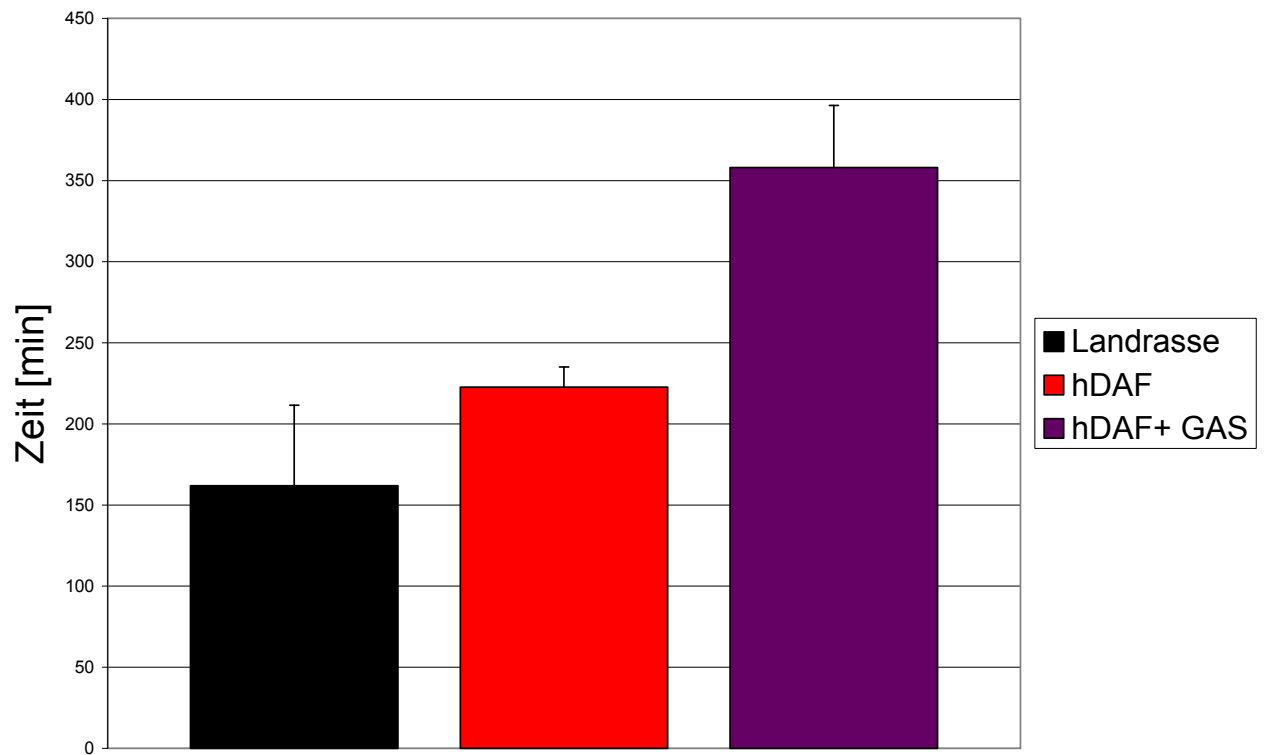
Gruppe D:  $7,3 \pm 1,3 \%$



3.b.18: prozentuale Gewichtszunahme

### 3.b.11 Perfusionsdauer

Die Gabe von GAS 914 konnte die Überlebenszeit der hDAF- transgenen Herzen von  $224 \pm 30$  Minuten weiter auf  $355 \pm 63$  Minuten steigern. Die Landrasseherzen schlugen lediglich  $165 \pm 49$  Minuten.



### 3.b.19: Perfusionsdauer

## **4. Diskussion**

### **4.1 Methodik und Pathophysiologie**

Die Veränderungen in der Gerinnungskaskade während einer hyperakuten und akut vaskulären Abstoßungsreaktion haben in der Xenotransplantationsforschung in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zu Beginn zielte die Forschung hauptsächlich auf die humoralen Mechanismen und die Komplementaktivierung ab. Die xenogene hyperakute Abstoßungsreaktion ist mit einer Gefäßschädigung, sowie einer Thrombozytenaggregation, einhergehend mit intravaskulärer Thrombose, assoziiert (Platt 1997). Bisher gibt es noch keine Untersuchungen der genauen Veränderungen in der Mikrozirkulation bei einer HAR in einem ex- vivo Modell. Ein Ziel dieser Studie ist die erstmalige Darstellung der Veränderungen in der Blutflussverteilung im xenoperfundierten Myokard unter Zuhilfenahme fluoreszierender Mikrosphären.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass fluoreszierende Mikrosphären im in- vivo Modell ein geeignetes Mittel sind, um Veränderungen im regionalen Blutfluß darzustellen (Kowallik 1991, Chien 1995, Thein 2002)

Bei der Injektion der fluoreszierenden Mikrosphären muss sicher gestellt sein, dass diese nur ein einziges Mal das zu untersuchende Organ erreichen, da sie sich sonst bei jedem Zyklus vermehrt im Gewebe anreichern würden. Injiziert man fluoreszierende Mikrosphären in ein lebendes Versuchstier, so wird eine Rezirkulation der fluoreszierenden Mikrosphären dadurch verhindert, dass sie im Kapillarbett der Lunge nahezu vollständig gebunden werden (Kowallik 1991). Um diese Rezirkulation zu verhindern, hätte in dem in dieser Studie verwendeten extrakorporalen Perfusionssystem das koronarvenöse Blut, welches über die Pulmonalarterie ausgeworfen wurde, verworfen werden müssen. Aufgrund der

begrenzten Menge an Perfusat ist im ex- vivo working- heart- Modell daher nur eine einmalige Applikation möglich.

Es wurde die Verteilung der Mikrosphären im Myokard zu dem Zeitpunkt, an dem die Nachlast gerade noch erreicht wurde, bestimmt. Zur Berechnung des exakten Blutflusses aus der Verteilung der fluoreszierenden Mikrosphären wurde ein Referenzwert zum Zeitpunkt der Applikation benötigt. Diese Referenz konnte nicht sicher bestimmt werden, da durch den niedrigen Blutfluss in der Aorta ascendens zum Zeitpunkt der Gabe der fluoreszierenden Mikrosphären eine exakte Bestimmung nicht mehr möglich war. Da aber die Herzleistung und die weiteren Untersuchungen in Abhängigkeit des Transplantatüberlebens dargestellt werden sollten, war eine frühere Applikation nicht möglich.

Eine quantitative Bestimmung des Blutflusses wäre durch eine Applikation der fluoreszierenden Mikrosphären zu einem frühen Zeitpunkt in einem modifizierten Versuchsablauf (nach Validierung) gegebenenfalls möglich. Durch die Applikation der fluoreszierenden Mikrosphären direkt in den linken Vorhof bei noch erreichter Nachlast muss von einer gleichmäßigen Verteilung im koronararteriellen Blut ausgegangen werden (Thein 2002, Chien 1995, Van Oosterhout 1995). Die Darstellung der Verteilung der Mikrosphären konnte dadurch in diesem Modell auch ohne Berechnung der absoluten Blutflusswerte erreicht werden. Die Werte könnten jedoch durch Hämorrhagien, die zu einer Ansammlung von Mikrosphären ohne hohen Blutfluss führen, verändert werden. Diese Ungenauigkeit besteht auch bei der Bestimmung der absoluten Blutflusswerte, da hier die Werte der Mikrosphärenkonzentration lediglich mit einem Faktor, der sich aus der Referenz ergibt, multipliziert werden.

Die Messwerte des Verhältnisses von subendomyokardialer zu subepimyokardialer Blutflussverteilung (Endo-/ Epi- Ratio) in- vivo vor der Explantation des

Spenderherzens entsprechen in allen vier Versuchsgruppen den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Choudhury 1999, Li 1996, Thein 2002).

Im ex- vivo Perfusionsmodell ist das Transplantatüberleben durch die Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte, welche nicht über eine renale oder hepatische Clearance entfernt werden können, sowie durch den Verbrauch von Blutbestandteilen, die die Herzen für ihren Stoffwechsel benötigen, unabhängig von einer immunologischen Abstoßungsreaktion, limitiert. Allein durch die extrakorporale Perfusion kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion mit einem Anstieg von z.B. TNF alpha, IL- 6, IL- 1, sowie zu einer Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten (Miller 1997, Menasche 1995, Schmoeckel 1996). Weiterhin kommt es zu einem zunehmenden Verbrauch wichtiger Blutbestandteile, welche nicht resynthetisiert werden. Daneben limitiert die physikalische und mechanische Belastung der Herzen im ex- vivo Modell die Pumpfunktion und Überlebensdauer der Herzen (Schmoeckel 1998).

Durch diesen Mechanismus kommt es in allen Versuchsgruppen im Laufe der Perfusion auch zu einem Abfall der Pumpleistung der Herzen, dargestellt durch den Schlagarbeitsindex.

#### **4.2 Beeinflussung der hyperakuten Abstoßungsreaktion durch hDAF unter Berücksichtigung der Makro- und Mikrozirkulation**

Bei einer Minderperfusion des Myokards, bedingt durch eine arterielle Ischämie, wie sie z.B. bei einem akuten Koronarsyndrom auftritt, kommt es zu einer Verschlechterung der endokardialen Durchblutung im Sinne einer „Minderdurchblutung der letzten Wiese“ mit einem daraus resultierenden Abfall der Endo/ -Epi -Ratio (Colonna 2000, Bussemaker 1997, Li 1996, Hoffmann 1978).



Im Gegensatz hierzu kam es in den durchgeführten Experimenten bei den xenogen abgestoßenen Landrasseherzen zu keiner signifikanten Änderung der Endo-/ Epi Ratio bei hyperakuter Abstoßung. Ein nicht signifikanter Anstieg, d.h. eine subendokardiale Mehranreicherung von Mikrosphären, war bei HAR in den nicht transgenen Herzen zu verzeichnen. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass interstitielle Hämorrhagien und Gefäßschäden vor allem im inneren Teil des Myokards entstehen, während venöse Thrombosen bevorzugt den subepikardialen Teil des Myokards betreffen (Rose 2000, Goddard 2002, Rose 2001). Diese epimyokardiale venöse Abflussstörung mit endomyokardialem Rückstau und Einblutung in das Gewebe könnte die verstärkte endomyokardiale Ablagerung von Mikrosphären bei den Landrasseherzen erklären.

Bei den hDAF- transgenen Herzen kam es während der Xenoperfusion zu einem signifikanten Abfall der Endo-/ Epi- Ratio am Versuchsende. Diese Veränderung kann entweder durch eine Minderperfusion des endomyokardialen oder durch eine vermehrte Durchblutung des epimyokardialen Gewebes bedingt sein. Unter Berücksichtigung histopathologischer Beobachtungen in der eigenen Arbeitsgruppe und der internationalen Literatur (Schmoeckel 1998, Alwayn 2000, Rose 2002) ist eine Verschlechterung der subendokardialen Durchblutung von transgenen Schweineherzen im Vergleich zu der von nicht transgenen Schweineherzen bei Xenoperfusion nicht zu erwarten. Daher kann man die Änderung der Endo-/ Epi- Ratio zugunsten des Subepimyokardiums bei hDAF- transgenen Herzen am wahrscheinlichsten dadurch erklären, dass die hDAF- Transgenität einen Schutz bevorzugt an den epimyokardialen Gefäßen, welche hauptsächlich von Thrombosen betroffen sind, bewirkt. Darüber hinaus kann man postulieren, dass es in den hDAF- transgenen Herzen zu geringeren Hämorrhagien im Endomyokardium und somit zu

einer geringeren Ablagerung von Mikrosphären im Gewebe und der damit erhöhten subendomyokardialen Mikrosphärenkonzentration kommt.

Die Veränderungen des Koronarflusses während der Perfusion zeigen ebenfalls einen protektiven Effekt von hDAF bezüglich der Makrozirkulation. Der Koronarfluss stieg in allen Gruppen innerhalb der ersten 15 Minuten an. Dies kann als Zeichen einer Vasodilatation während der Reperfusionsphase, nach der durch die kalte Ischämie bedingten Vasokonstriktion, bedingt durch die zu Beginn der Perfusion bestehenden hohen Spiegel an vasokonstriktiv wirkenden Substanzen, gedeutet werden (Schmoeckel 1996). Anschließend kam es bei den Landrasseherzen zu einem kontinuierlichen Abfall des Koronarflusses bis zum Perfusionsende, welcher sich durch zunehmende thrombotische Verschlüsse und eine zunehmende Vasokonstriktion erklären lässt. Bei den hDAF- transgenen Herzen stieg der Koronarfluss jedoch an und blieb in der ersten Stunde auf ungefähr gleichem Niveau. Schmoeckel et al. machten eine ähnliche Beobachtung, jedoch stieg in dieser Versuchsreihe der Koronarfluss bis zum Perfusionsende sowohl bei xenogen als auch autolog perfundierten Herzen an. Der Anstieg war, wie bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit, bei den hDAF- transgenen Herzen stärker als bei den nicht transgenen Schweineherzen.

Bereits in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Endothelzellen durch eine Komplementaktivierung mit einer Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. E-Selectin einhergeht, (Solvik 2001) durch hDAF-Transgenität verringert wird (Fecke 2002). Die durch Antikörper und das Komplementsystem gesteigerte Gerinnungsaktivität (Sims 1991, Saadi 1995, Solvik 2001, Bühler 2001) wird durch eine Blockade durch hDAF verringert.

Eine Verbesserung der epimyokardialen Perfusion mit einer geringeren Thromboseneigung würde auch den höheren Koronarfluss bei den hDAF-

transgenen Herzen erklären. Der erhöhte Koronarfluss in der hDAF- Gruppe bei gleichzeitig verbesserter epimyokardialer Durchblutung lässt vermuten, dass der protektive Effekt von hDAF vor allem die epikardialen Gefäße betrifft.

Dieser Beobachtung entspricht ein Anstieg des Koronarwiderstands bei den Landrasseherzen, der bis zum Transplantatversagen anstieg, während bei den hDAF- transgenen Herzen der Koronarwiderstand zunächst anstieg und zu Ende der Perfusion etwas abfiel.

Das größte Herzzeitvolumen, bezogen auf das Gewicht der Herzen, wurde von den hDAF- transgenen Herzen erreicht. Das Herzzeitvolumen war bei den Landrasseherzen, durch die oben beschriebenen Mechanismen bedingt, am geringsten.

Die arterio- venöse Sauerstoffdifferenz stieg in allen Gruppen bei Perfusionsbeginn an und fiel zum Perfusionsende hin ab. Bei den hDAF- transgenen Herzen war der Abfall schwächer ausgeprägt als bei den Landrasseherzen. Dies entspricht der Beobachtung einer verbesserten Myokardperfusion. Der in allen Gruppen nachweisbare Anstieg der  $AVDO_2$  zu Beginn der Perfusion lässt sich durch die zu diesem Zeitpunkt bestehende Vasokonstriktion und geringere Perfusion erklären. Untersuchungen der Reperfusion in klinischen Studien zeigten, dass es unmittelbar zu Beginn der Reperfusion nach extrakorporaler Zirkulation bei Herzoperationen in den ersten Minuten nach der Ischämie bei Anstieg der Koronardurchblutung zu einer hohen  $AVDO_2$ , kommt, welche sich dann innerhalb der ersten halben Stunde nach Reperfusion wieder normalisiert (Digerness 1988, Kirklin 1990).

Der signifikant höhere Sauerstoffverbrauch der Landrasseherzen kann als Reaktion auf den erhöhten Sauerstoffbedarf bei beginnender HAR gedeutet werden. Der am Anfang der Perfusion erhöhte Koronarfluss entspricht diesem Mechanismus. Offensichtlich scheinen die thrombotischen Ereignisse in den ersten Minuten der

HAR noch nicht den gesamten Koronarfluss zu verringern, da es erst nach 15 Minuten zu einem Abfall des Koronarflusses bei den Landrasseherzen kommt. Schmoeckel et al verzeichneten bei den im working- heart- Modell xenogen perfundierten Schweineherzen sogar einen Anstieg des Koronarflusses bis zu einer Perfusionsdauer von 180 Minuten und erklären dies durch den Abfall vasokonstriktiver Substanzen, wie z.B. Endothelin 1 oder die verminderte Bildung des Vasodilatators NO während Ischämie, bzw. Reperfusion (Schmoeckel 1998).

Die Leistung der Herzen wurde über den Schlagarbeitsindex dargestellt. Die Leistung der transgenen Herzen lag über denen der Landrasseherzen. Bei Untersuchungen mit hDAF- transgenen Herzen mit einem ähnlichen Modell konnte bereits gezeigt werden, dass die Leistung von hDAF- transgenen Herzen deutlich über der von Landrasseherzen liegt und im ex- vivo- Perfusionsmodell sogar nahezu der von allogenen perfundierten Rhesusaffenherzen gleicht (Schmoeckel 1998).

Der Verbrauch an Fibrinogen, Antithrombin III und Protein C während der Perfusion war bei der Kontrollgruppe am deutlichsten. Ein geringerer Verbrauch entstand bei der Xenoperfusion hDAF- transgener Herzen. In der Vergangenheit konnte in vielen Untersuchungen die Verknüpfung der humoralen Immunantwort und des Komplementsystems mit der damit verbundenen Aktivierung der Endothelzellen gezeigt werden. Neben seiner cytotoxischen Wirkung triggert der Membranangriffskomplex die Synthese von inflammatorischen Zytokinen, welche das Endothel aktivieren und inflammatorische und prokoagulatorische Prozesse in Gang setzen. Bei einer Verhinderung der Bildung des Membranangriffskomplexes durch hDAF ist mit einer geringeren Aktivierung der Endothelzellen mit konsekutiv schwächerer Ausbildung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) zu rechnen, was sich auch in den genannten, laborchemisch bestimmten Gerinnungsparametern zeigt.

Die Endothelzellaktivierung führt zu einer Expression von prokoagulatorischen Faktoren, wie z.B. Platelet Activating Factor oder Tissue Factor. (Kopp 1997, Saadi 1995). Dieser Effekt wird noch durch die Tatsache verstärkt, dass porciner Tissue Factor pathway inhibitor nicht effektiv den humanen Faktor X neutralisieren kann (Siegel 1997). Eine geringere Aktivierung der Endothelzellen durch eine Blockade durch hDAF kann über diesen Mechanismus eine Reduktion einer DIC mit vermindertem Verbrauch an Fibrinogen, AT III und Protein C erklären.

Durch erhöhte Spiegel von inflammatorischen Mediatoren kommt es weiter zu einer verminderten Transkription und Ausschüttung von Thrombomodulin durch die Endothelzellen. Im ex- vivo Modell werden inflammatorische Zytokine wie TNF alpha, welches die Thrombomodulinsekretion reduziert, durch den Kontakt mit der Fremdoberfläche des Perfusionssystems erhöht (Schmoeckel 1998). Dies hat zur Folge, dass dieser Mechanismus und dessen Beeinflussung durch hDAF im ex- vivo Modell teilweise von systemischen Effekten überlagert ist. Thrombomodulin ist ein wichtiger Regulator der Thrombinaktivität und aktiviert zugleich Protein C, welches Protein S bindet und als Komplex die Gerinnungsfaktoren V und VIII hemmt.

Porcine Endothelzellen produzieren darüber hinaus deutlich weniger Protein C, als humane Endothelzellen unter vergleichbaren Bedingungen. Die Blockade des Komplementsystems und die damit verbundene geringere Aktivierung der Endothelzellen könnten eine Steigerung der supprimierten Thrombomodulinsekretion bewirken. Es gibt aber Hinweise, dass porcines Thrombomodulin nicht mit humanem Thrombin und Protein C kreuzreagiert, und somit ein Effekt von hDAF auf diesen Mechanismus in Zweifel gezogen werden muss (Siegel 1997, Lawson 1997).

Durch die Endothelzellaktivierung und durch den komplementvermittelten Endothelschaden kommt es zur Verringerung der Bildung von antikoagulatorischen Substanzen, wie z.B. Heparansulfat oder ATP- Diphosphohydrolase durch die

Endothelzellen (Robson 1997, Platt 1990). Heparansulfat wirkt als Kofaktor von Antithrombin III und spielt zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Verankerung anderer antikoagulatorisch wirksamer Substanzen auf den Endothelzellen (Platt 1990). Bei der Aktivierung der Endothelzellen kommt es zu einer signifikant geringeren Expression von Heparansulfat auf den Endothelzellen und somit zu einem vermehrten Verbrauch von Fibrinogen, AT III und Protein C als Marker einer DIC.

Siegel und Jurd zeigten, dass aktivierte, porcine Endothelzellen in der Lage sind, humanes Prothrombin in Thrombin umzuwandeln. Thrombin bewirkt die Spaltung von Fibrinogen in Fibrin und spielt somit eine entscheidende Rolle in der plasmatischen Blutgerinnung, wie auch in der Thrombozytenaggregation. Ein Einfluss der verminderten Endothelzellaktivierung durch hDAF auf diesen Mechanismus mit daraus resultierendem geringerem Verbrauch an Gerinnungsfaktoren ist denkbar (Siegel 1997, Jurd 1996).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass porcine Endothelzellen in Anwesenheit von inaktiven Membranangriffskomplexen, die nicht mehr in der Lage waren, die Zellmembran zu durchdringen, bzw. in Anwesenheit von Komplement und gegen porcine Endothelzellen gerichtete Antikörpern, vermehrt Adhäsionsmoleküle ( z. B. ICAM- 1, VCAM-1, E- Selectin) und Tissue Factor exprimierten (Tedesco 1997, Saadi 1995). Eine Unterbrechung der Komplementkaskade durch hDAF führt zu einer verminderten Expression dieser Moleküle und hat somit einen positiven Einfluss auf die Ausbildung einer DIC.

Die Ablagerung des Membranangriffskomplexes C5b-9 auf dem Endothel bewirkt eine Veränderung des Zellverbandes mit der Zerstörung der Zellintegrität. Dadurch kommt es zur Freilegung von Strukturen der subendothelialen Matrix, an die von Willebrand Faktor bindet. Der GPIIb Rezeptor auf Thrombozyten bindet an vWF und vermittelt eine Expression von GPIIb/IIIa auf den Thrombozyten mit der Bindung von

Fibrinogen und der Plättchenaggregation. Es konnte gezeigt werden, dass porciner vWF, im Gegensatz zu humanem vWF, auch ohne Scherstress mit humanem GPIIb auf den Thrombozyten interagiert (Schulte am Esch 1997). Durch die hDAF-Transgenität und GAS 914 kann zum einen die Bildung des MAC mit nachfolgendem Freilegen von subendothelialen Strukturen vermindert werden, zum anderen wird über die zusätzliche Gabe von Tirofiban die darauf folgende über GPIIb/IIIa vermittelte Thrombozytenaggregation verhindert.

Galbusera und Kollegen untersuchten in- vitro den Einfluss des Komplementsystems in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Thrombozyten auf die Bildung von Thrombozytenaggregaten und zeigten, dass es auch unabhängig von der Thrombozytenaktivierung zu einer Gerinnungsaktivierung durch humanes Serum kommt, was die Bedeutung der Komplementhemmung durch hDAF zur Verhinderung der Ausbildung einer DIC verstärkt. Hierzu wurden porcine aortale Endothelzellen mit humanem oder porcinem Serum inkubiert. Eine Komplementaktivierung wurde in einer Gruppe mit sCR1 blockiert, der Einfluss der Thrombozytenaktivierung wurde durch die Gabe von ADP untersucht. Durch die Blockade des Komplementsystems konnte eine Thrombusbildung verhindert werden. Eine Thrombusbildung mit der Expression von Adhäsionsmolekülen (P-Selectin, Vitronectinrezeptor) auf den Endothelzellen fand auch ohne die Aktivierung der Thrombozyten statt. Die Inkubation der Endothelzellen mit humanem Serum führte zu einem signifikanten Anstieg von Sauerstoffradikalen, welche an der Expression von Adhäsionsmolekülen beteiligt sind, da es nach der Gabe von Antioxidantien zu einer geringeren Thrombusformation mit Expression von Adhäsionsmolekülen kam (Galbusera 2005). Durch die Bindung der Antikörper auf der xenogenen Endotheloberfläche kommt es zu der Aktivierung des Komplementsystems auf dem klassischen Weg mit der Bildung des Membranangriffskomplexes. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt

werden, dass durch eine ständige spontane Konversion in die aktive Form konvertiertes C3 (C3b) an xenogene Oberflächen bindet und somit den alternativen Weg des Komplementsystems auslösen kann. Bindet C3b an humane Endothelzellen, wird es über die Komplementregulatoren Faktor H bzw. MCP gebunden und neutralisiert. Kommt es dennoch zu einer weiteren Aktivierung des alternativen Weges, so erfolgt im autologen System eine Inaktivierung über hDAF. Diese Regulationsmechanismen des alternativen Weges greifen bei xenogener Reaktion nicht (Forty 1992, 1993, Suckfüll 1994). Durch hDAF wird C2 aus der Bindung an C4 verdrängt, wodurch es zu einer Unterbrechung des klassischen Weges kommt. Eine Unterbrechung des alternativen Weges über hDAF geschieht über eine Inaktivierung der C3 Konvertase des klassischen Weges. Durch diesen Mechanismus kann erklärt werden, dass es in den vorliegenden Versuchen zu dem signifikant geringeren Verbrauch sowohl an C3 als auch C4 bei den hDAF-transgenen Herzen kommt. In verschiedenen Untersuchungen konnte eine effektive Blockade des Komplementsystems bei heterotopen und orthotopen xenogenen Herztransplantationen gezeigt werden (Schmoeckel 1996, 1997, Pierson 1997).

Die effektive Blockade des Komplementsystems ist abhängig von der Dichte der hDAF- Expression auf dem Endothel und variiert zwischen den Spendertieren (Carrington 2001, Liu 2007, Sun 2005). Die Höhe der benötigten Expressionsdichte wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Carrington fordert eine mindestens zweifach höhere Expressionsdichte auf dem Schweineendothel als auf humanen Endothelzellen. Liu stellte fest, dass unterschiedlich hohe Expressionsdichten bis zum 30 fachen der humanen Expression von hDAF auf dem Endothel, abhängig von der Zytotoxizität des Serums, notwendig sind, um eine suffiziente Suppression der Komplementkaskade zu erreichen (Liu 2007). Die in den eigenen Versuchen verwendeten Schweine wurden vor der Perfusion an Endothelproben im Ohr



immunhistochemisch auf ihre hDAF- Expression hin untersucht. Hier zeigte sich eine gleiche Verteilung auf Arterien und Venen. Die Verteilung von hDAF auf dem Endothel scheint daher kein Grund für die in den Mikrosphärenuntersuchungen vermutete Wirkung von hDAF bezüglich einer Verhinderung von vor allem subepimyokardialen Gefäßverschlüssen zu sein. Es ist bekannt, dass Venolen der Hauptort der Leukozytenadhäsion und -emigration sind. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass das venöse Endothel bei hyperakuter, beziehungsweise akuter Abstoßung eine wesentliche Rolle spielt (Lemstrom 1995, Rose 2000). Wie oben beschrieben, betrifft die Vaskulopathie bei HAR vor allem venöse, epikardiale Gefäße. Eine Protektion von hDAF, vor allem des epikardialen Myokards, wie in den Mikrosphärenuntersuchungen in den eigenen Versuchen gezeigt, deckt sich mit den oben beschriebenen Beobachtungen.

Bei den nicht- transgenen Herzen kam es im Vergleich zu den hDAF- transgenen Herzen zu einem stärkeren Anstieg der Creatininphosphokinasekonzentration als Marker einer kardiomyozytären Schädigung. Die Unterschiede waren ab einer Perfusionszeit von 30 Minuten signifikant. Ähnliche Beobachtungen machten Schmoeckel et al. bei Perfusionsversuchen hDAF- transgener Schweineherzen im ex- vivo Modell (Schmoeckel 1998). Der schnelle Anstieg kann durch die innerhalb von Minuten ablaufende HAR mit der Aktivierung des Komplementsystems und der Bildung des Membranangriffskomplexes erklärt werden. Dies führt zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit interstitiellen Ödemen und der Extravasation zytotoxischer Substanzen (Dalmaso 1992, Baldwin 1992, Saadi 1995)

Bedingt durch eine interstitielle und intrazelluläre Ödembildung kam es während der Perfusion bei den Landrasseherzen zu einer deutlich höheren Gewichtszunahme als bei den hDAF- transgenen Herzen. Eine deutlich reduzierte Zerstörung von Kardiomyozyten, sowie Endothelzellen durch die hDAF- Transgenität wurde bereits

in verschiedenen Studien gezeigt. Histologisch konnten bei hDAF- transgenen Herzen deutlich geringere Hämorrhagien, interstitielle Ödeme und Ablagerung von Entzündungszellen nachgewiesen werden (Schmoeckel 1996,1998, Wallwork 1998). Durch den positiven Einfluss von hDAF auf die Ausbildung einer Verbrauchskoagulopathie kann die Extravasation und Ödembildung zusätzlich verringert werden. Die in den Mikrosphärenuntersuchungen postulierte Protektion vor allem der subepimyokardialen Gefäße, an denen die thrombotischen, vor allem venösen Gefäßverschlüsse stattfinden, würde die verminderte Gewichtszunahme durch interstitielle Ödembildung bei den hDAF- transgenen Herzen zusätzlich erklären.

#### **4.3 Beeinflussung der hyperakuten Abstoßungsreaktion durch hDAF und Tirofiban unter Berücksichtigung der Makro- und Mikrozirkulation**

Cowan stellte fest, dass durch hDAF transgene Schweine die HAR verhindert oder zumindest reduziert werden kann, es jedoch dennoch zu einer Koagulopathie kommt (Cowan 2000). In den vorliegenden Versuchen kam es durch die Gabe von Tirofiban nicht zu einer wesentlichen Veränderung der Endo-/ Epi- Ratio bei den hDAF- transgenen Schweineherzen, bei laborchemisch gering ausgeprägter Verbrauchskoagulopathie. In der Literatur werden unterschiedliche Ergebnisse bezüglich einer Applikation von GP IIb/ IIIa Antagonisten bei xenogener Abstoßung beschrieben. Candinas beschreibt ein verlängertes Überleben von heterotop in Lewis Ratten transplantierten Meerschweinchenherzen bei hoch dosierter Applikation des GP IIb/ IIIa Antagonisten GPI 562 (Candinas1996). Ebenso konnte Onozuka eine signifikante Verlängerung des Transplantatüberlebens bei xenogener Lungentransplantation von Kaninchen auf Hunde durch Gabe eines GP IIb/ IIIa Antagonisten zeigen (Onozuka 2003). Die Wirksamkeit von GP IIb/ IIIa Antagonisten

konnte weiter bei der ex- vivo Perfusion von Kaninchenkarotiden belegt werden (Huang 1999). Ein Grund dafür, dass es bei den durchgeführten ex- vivo Perfusionen zu keiner signifikanten Änderung der Mikrosphärenverteilung kommt, könnte sein, dass der laborchemisch messbare positive Einfluss von Tirofiban auf eine Koagulopathie noch nicht im beobachteten Zeitraum zum Tragen kommt.

Die topographische Mikrosphärenverteilung von apikal nach basal bzw. innerhalb einer Schicht, waren im Gegensatz zu der endo-/ epikardialen Mikrosphärenverteilung nicht signifikant unterschiedlich, so dass von einer homogenen topographischen Verteilung der thrombotische Gefäßverschlüsse im linken Ventrikel zwischen basal und apikal, bzw. in einer Schicht ausgegangen werden kann.

Die Thrombozytenaggregationshemmung durch die Applikation von Tirofiban führte zunächst zu einem geringeren Anstieg des Koronarflusses als bei den Landrasseherzen als auch den hDAF- transgenen Herzen. Bis zum Ende der Perfusion stieg der Koronarfluss jedoch kontinuierlich an. Dies ließe sich durch einen positiven Effekt von Tirofiban mit verminderten Koronargefäßverschlüssen erklären. Die Effekte sind jedoch offensichtlich nicht stark genug, um hier eine signifikante Veränderung bei den Mikrosphärenuntersuchungen im Vergleich zu den beiden anderen Therapiegruppen zu bewirken.

Zu Beginn der Perfusion bestand in der Gruppe, deren Perfusat Tirofiban erhielt, ein fast viermal so hoher Koronarwiderstand als in der hDAF Gruppe ohne Tirofibanapplikation. Da es sich um ebenfalls hDAF- transgene Schweineherzen handelte, lässt sich dieser Unterschied nur durch unterschiedliche Reaktionen der Herzen auf die Ischämie erklären. Dieser Unterschied ist vermutlich auch der Grund für den zunächst geringeren Anstieg des Koronarflusses in der Tirofibangruppe.

Eine Steigerung der Herzleistung im Schlagarbeitsindex konnte durch Tirofiban nicht erreicht werden. Es ist möglich, dass der zusätzliche Effekt von Tirofiban im frühen Zeitraum der HAR noch keinen wesentlichen Einfluss auf die Herzleistung hat. In der internationalen Literatur gibt es keine Hinweise auf eine pharmakologisch negative Auswirkung von Tirofiban auf die Pumpfunktion des Herzens. Es ist denkbar, dass die Thrombozytenaggregationshemmung in der frühen Phase der HAR noch keine für die Pumpfunktion oder das Transplantatüberleben entscheidende Rolle spielt und sich erst später messbare Vorteile bezüglich dieser Parameter zeigen.

Candinas et al führten bei heterotop in Lewisratten transplantierten Meerschweinherzen eine Thrombozytenaggregationshemmung mit dem GPIIb/IIIa Antagonisten GPI 562 durch und beschrieben ein verlängertes Überleben und eine verbesserte Funktion der Herzen, welche sich durch die zusätzliche Gabe von Cobra venom factor noch verbesserte (Candinas 1996). Onozuka et al. beschrieben bei der Transplantation von Kaninchenlungen auf Hunde, welche mit einem GPIIb/ IIIa Antagonisten behandelt wurden, ein verlängertes Transplantatüberleben bei geringerem Thrombozytenverbrauch (Onozuka 2003).

In anderen Untersuchungen wurde keine Verbesserung der Organfunktion durch die Gabe von GPIIb/IIIa Antagonisten beschrieben. Fiane beschrieb zwar histologisch geringere thrombotische Ereignisse, sah aber keine Vorteile bezüglich der Transplantatfunktion bzw. des Transplantatüberlebens in xenoperfundierten Schweinenieren (Fiane 1999).

Die laborchemischen Analysen dieser Studie ergeben Hinweise, dass es auch bei suffizienter Unterdrückung des Komplementsystems und effektiver Verringerung der xenogenen Antikörper zu einer Gerinnungsaktivierung kommt. Obwohl es bei den transgenen Herzen zu einem deutlich geringeren Verbrauch an Fibrinogen, ATIII, und Protein C kam, war der Thrombozytenverbrauch in der hDAF- Gruppe nicht

wesentlich geringer als in der Kontrollgruppe. Ein Grund hierfür kann sein, dass die Aktivierung der Gerinnung auch schon in früheren Phasen der Komplementkaskade, z.B. durch eine Gerinnungsaktivierung über den aktiven Komplementfaktor C1q, abläuft. In anderen Untersuchungen zeigte sich, ähnlich wie in den Ergebnissen dieser Experimente, dass es trotz Blockade der Komplementkaskade zu einer Gerinnungsaktivierung mit Ausbildung einer DIC kommt. Cowan beobachtete, dass es bei der Transplantation CD 55, CD 59 und H-Transferase transgener Nieren in Paviane zur Ausbildung einer Verbrauchskoagulopathie ohne Ausbildung einer hyperakuten Abstoßungsreaktion kam. Die H-Transferase, welche die Bildung des Gal $\alpha$ (1-3)-Gal-Epitops verringert, war allerdings nicht hoch konzentriert auf dem Endothel vorhanden, so dass lediglich von einer CD 55/59-Transgenität ausgegangen werden musste (Cowan 2000). Dies spricht ebenfalls für eine Triggerung einer DIC durch frühe Komplementfaktoren oder ohne die Beteiligung des Komplementsystems. Die geringe Beeinflussung des Thrombozytenverbrauchs durch hDAF, sowie deren Verminderung durch die Gabe von Tirofiban, entsprechen diesen Beobachtungen. Durch diese komplexe Aktivierung des Gerinnungssystems kommt der Thrombozytenaggregationshemmung durch Tirofiban auf der gemeinsamen Endstrecke der Thrombozytenaggregation besondere Bedeutung zu, wie sich am positiven Einfluss von Tirofiban auf den Verbrauch von Antithrombin III, Protein C, Fibrinogen, sowie der Thrombozyten erkennen lässt.

#### **4.4 Beeinflussung der hyperakuten Abstoßungsreaktion durch hDAF und GAS**

##### **914 unter Berücksichtigung der Mikro- und Makrozirkulation**

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem Anti-Gal $\alpha$ (1-3)-Gal-IgM-Antikörper die hyperakute Abstoßung vermitteln, während Anti-Gal $\alpha$ (1-3)-Gal-IgG- und IgA-Antikörper bei der HAR eine geringere Rolle zu spielen scheinen. Ein Grund für eine geringere zytotoxische Aktivität könnte sein, dass IgG-Antikörper

weniger stark in der Lage sind, das Komplementsystem auf dem klassischen Weg zu aktivieren. Schaapherder zeigte, dass der größte Teil der IgG Antikörper, welche an porcine Endothelzellen binden, dem Subtyp IgG1 angehören, welcher Komplement nicht auf dem klassischen Weg aktiviert. Dehoux beschrieb ein signifikant längeres Überleben von porcinen Nierentransplantaten in Pavianen durch eine Neutralisation von Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgM Antikörpern. Im Gegensatz hierzu konnte bei IgG Antikörpern bei diesen Versuchen kein verlängertes Transplantatüberleben gezeigt werden. Von Kroshus wurde eine Verlängerung der Überlebenszeit von ex- vivo mit Humanblut xenoperfundierten Schweineherzen durch die selektive Reduktion von IgM Antikörpern im Perfusat beschrieben (Platt 1991, Dehoux 2000, Kroshus 1996, Schaapherder 1994).

Die Daten verschiedener Autoren, sowie die Ergebnisse in der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass bei manchen transgenen hDAF- Empfängertieren trotz gleicher Immunsuppression eine HAR entstehen kann (Schmöckel 1998, Lam 2004, Zhong 2003). Grund hierfür könnten individuell sehr hohe Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal- Antikörperspiegel der Empfängertieren sein. Die hDAF- Transgenität reicht bei diesen Empfängertieren vermutlich nicht aus, eine suffiziente Verhinderung einer HAR zu bewirken (Lam 2004). Gerade in dieser Phase kommt der Elimination der xenoreaktiven Antikörper durch z.B. GAS 914 eine zusätzliche entscheidende Funktion bei der Überwindung der HAR zu.

Die Gabe von Gas 914 vor Perfusionsbeginn konnte die Konzentration sowohl der Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal- IgM als auch der -IgG Antikörper signifikant verringern. Gas 914 bindet sowohl IgG, als auch IgM Antikörper. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Subtypen. In der GAS 914- Gruppe kam es nach Perfusionsbeginn zu keinem weiteren wesentlichen Abfall der Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgM- und IgG- Antikörper.

Von Zhong et al. wurde eine signifikante Reduktion der Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Antikörper durch GAS 914 bei heterotoper xenogener Nierentransplantation hDAF-transgener Schweinenieren in Paviane beschrieben, es zeigte sich aber keine signifikante Verlängerung des Transplantatüberlebens (Zhong 2003). In den eigenen Versuchen konnte ein deutlich längeres Transplantatüberleben durch die Gabe von GAS 914 erreicht werden. Ein Grund für den Unterschied könnte sein, dass im ex-vivo- Modell nur die frühe hyperakute Abstoßung dargestellt werden kann. Bei dieser Form der Abstoßung spielen fast ausschließlich Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Antikörper eine Rolle, die von GAS 914 gebunden werden können. Der gleichzeitige Abfall der Gesamtmenge der Anti- Schwein hämolytischen Antikörper (APA) nach Gabe von GAS 914 bestätigt dies. Bei der in- vivo Xenotransplantation von Schweineherzen auf Paviane wird diese Phase überwunden, und es werden vermehrt Antikörper gebildet, die sich nicht gegen das Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Epitop richten (Non Gal- Antikörper). Diese von GAS 914 nicht beeinflussbaren Antikörper spielen eine entscheidende Rolle in der späteren akut vaskulären Abstoßung (Brandl 2005, Lam 2004, Chen 2006). Ein Anstieg der APA- Antikörper bei Pavianen mit xenogen transplantiertem Schweineherz nach Überwindung der HAR konnte auch bei den Versuchen in der eigenen Arbeitsgruppe beobachtet werden. Während die Antikörper gegen das Gal $\alpha$ (1-3)- Gal- Epitop durch kontinuierliche Gabe von GAS 914 dauerhaft supprimiert werden konnten, kam es im weiteren Verlauf zu einem zunehmenden Anstieg der nicht Gal $\alpha$ (1-3)- Gal spezifischen Anti- pig- hämolysierenden- Antikörper (APA).

Die Analyse der Gesamtmenge der IgG- und IgM- Antikörper zeigte keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Gruppen. IgM Antikörper gegen das Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Epitop stellen lediglich 2 - 4 %, die des IgG- Subtyps 1% der Gesamtmenge dieser Immunglobulinsubtypen dar. Durch eine vollständige Elimination der Anti-

Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Antikörper ist daher keine wesentliche Veränderung der Gesamtmenge der IgG- und IgM- Antikörper zu erwarten gewesen (Galili 1987, Lawson 1996).

Die zusätzliche Gabe von GAS 914 bewirkte jedoch keine wesentliche Veränderung der Endo-/ Epi- Ratio im Vergleich zu den hDAF- transgenen Herzen. Der Effekt der direkt durch Antikörper hervorgerufenen Endothelzellaktivierung spielt vermutlich erst in den späteren Phasen der xenogenen Abstoßung eine Rolle, da der Beobachtungszeitraum im ex- vivo- Modell nur wenige Stunden beträgt. Insbesondere die Typ II Aktivierung der Endothelzellen, die im Gegensatz zur Typ I Aktivierung der Endothelzellen von der Protheinsynthese abhängig ist, kann im Zeitrahmen von exvivo Perfusionsversuchen nicht dargestellt werden (Palmetshofer 1998).

Es kam durch die Gabe von GAS914 zu einer Verbesserung der Herzfunktion. Der Schlagarbeitsindex verbesserte sich noch zusätzlich gegenüber der hDAF- Gruppe. Der positive Effekt einer Applikation von GAS 914 zusätzlich zu der hDAF- Transgenität deckt sich mit den Beobachtungen, die bei in- vivo Schwein auf Primat- Xenotransplantationen auch in der eigenen Arbeitsgruppe festzustellen waren (Brandl 2005). Obwohl die Ausbildung einer HAR durch eine Komplementaktivierung durch hDAF- transgene Schweine weitgehend kontrolliert werden kann ( Schmoeckel 1998, 1997), besitzen Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Antikörper, wie bereits beschrieben direkten Einfluß auf z.B die Endothelzellaktivierung, wodurch der direkten Verringerung der Anti- Gal $\alpha$ (13)- Gal Antikörper- Spiegel im Serum auch in der frühen Phase der xenogenen Abstoßung eine wichtige Bedeutung zukommt (Palmetshofer 1998). Durch die Unterdrückung dieser antikörperspezifischen Wirkung auf das Endothel, sowie durch den zusätzlichen Einfluss verringerter Antikörperspiegel auf eine nicht vollständig durch die hDAF- Transgenität



unterdrückte Komplementaktivierung (Lam 2004), kann ein positiver Einfluss auf die Herzfunktion erklärt werden.

Der Anstieg der gemessenen Herzenzyme CK, CK- MB, GOT und LDH war bei den Landrasseherzen gegenüber den hDAF- transgenen Herzen signifikant erhöht. Am Perfusionsende zeigten die als Marker für eine myokardiale Schädigung dienenden Enzyme CK, GOT und LDH eine nicht signifikant geringere Konzentration der Herzenzyme in der GAS 914 - Gruppe. Dies ließe sich durch einen zusätzlichen protektiven Effekt von GAS 914 erklären. Am deutlichsten war dieser Unterschied bei der herzmuskelspezifischen CK- MB, bei der die Konzentration während der gesamten Perfusion deutlich unter der der ohne GAS 914 perfundierten hDAF- transgenen Herzen lag. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen in-vivo, in denen der positive Effekt von GAS 914 durch die Reduktion der zytotoxischen Antikörper auf die kardiomyozytäre Schädigung durch Mikorthromben beschrieben wurde (Brandl 2005, Brandl 2007, Tuan 2004, Zhong 2003).

Durch die zusätzliche Gabe von GAS 914 wurde der Verbrauch der Komplementfaktoren C3 und C4 weiter reduziert. Die Unterschiede waren in Bezug auf C4 am Versuchsende signifikant. Selbst bei einer hohen Expression von hDAF auf dem porcinen Endothel ist eine Komplementaktivierung möglich (Liu 2007, Lam 2004). Eine Reduktion der Konzentration von xenoreaktiven Antikörpern im Perfusat durch GAS 914 könnte den geringeren Komplementverbrauch erklären.

Durch die geringere Konzentration an zirkulierenden, xenoreaktiven Anti- Gal $\alpha$ (13)- Gal- Antikörpern durch die Gabe von GAS 914 wurde die Gewichtszunahme im Vergleich zu den hDAF- transgenen Schweineherzen, die kein Tirofiban in das Perfusat erhielten, weiter verringert. Ein geringerer antikörpervermittelter Endothelschaden könnte diese Reduktion der Gewichtszunahme erklären. Bei xenogener Nierentransplantation von hDAF- transgenen Schweinen auf Paviane, die

mit GAS 914 therapiert wurden, zeigte sich eine reduzierte Abstoßungsreaktion mit geringerer Vaskulitis und weniger Hämorrhagien (Zhong 2003). Einen wesentlichen Einfluss von GAS 914 auf die endo-/ epimyokardiale Mikrosphärenverteilung zusätzlich zur hDAF- Expression zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen nicht. Dennoch ist ein positiver Einfluss auf die Gerinnungsaktivierung auf Grund der hier beschriebenen Wechselwirkungen zwischen der humoralen Immunantwort und der Gerinnungsaktivierung möglich.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der Studie war die erstmalige Darstellung der Veränderungen der Myokardperfusion mit fluoreszierenden Mikrosphären bei der ex- vivo Xenoperfusion von nicht transgenen und hDAF- transgenen Schweineherzen und die weitere Beeinflussung dieser Veränderungen durch das lösliche Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Konjugat GAS 914 und den Thrombozytenaggregationshemmer Tirofiban.

Eine Bestimmung des absoluten Blutflusses im Gewebe setzt die Entnahme einer Referenzprobe aus der Aorta ascendens voraus, die in diesem Modell, vermutlich durch den späten Zeitpunkt der Applikation der Mikrosphären bedingt, nicht sicher gewonnen werden konnte. Es erfolgte daher nur die Quantifizierung der Mikrosphärenverteilung im Myokard und daraus die Berechnung der endo- zu epimyokardialen Blutflussverteilung.

In allen Gruppen ließ sich kein topographisch signifikanter Unterschied in der Mikrosphärenverteilung von apikal nach kaudal bzw. innerhalb einer Schicht am Ende der Perfusion nachweisen. Bei den nicht transgenen Schweineherzen zeigte sich eine nicht signifikante Veränderung der Endo-/ Epi -Ratio der Mikrosphärenverteilung transmural nach ex- vivo Xenoperfusion zu Gunsten des Endomyokards. Bei den hDAF- transgenen Herzen kam es zu einem Abfall der Endo-/ Epi- Ratio, was als Protektion des Epimyokardiums durch hDAF gedeutet werden kann. Eine in der Literatur beschriebene, vor allem epimyokardiale, venöse Thrombosierung der Gefäße deckt sich mit diesem Ergebnis. Durch die zusätzliche Gabe von GAS 914 oder Tirofiban konnte keine weitere Veränderung der Mikrosphärenverteilung erreicht werden. Die laborchemischen Untersuchungen zeigten jedoch, dass durch Tirofiban der Verbrauch von Fibrinogen, Antithrombin III, Protein C und der Thrombozytenverbrauch im Vergleich zu hDAF weiter gesenkt

werden konnten. Durch hDAF- Expression auf dem Endothel alleine konnte jedoch ebenfalls eine zum Teil signifikante Verringerung des Verbrauchs o.g. Gerinnungsfaktoren erreicht werden. Dies lässt sich durch den prokoagulatorischen Effekt der Komplementaktivierung, aber auch durch die damit verbundene Endothelzellaktivierung erklären. Diese positive Beeinflussung der abstoßungsassoziierten Gerinnungsaktivierung konnte in der vorliegenden Studie vermutlich auf Grund des kurzen Beobachtungszeitraums keinen wesentlichen Einfluss auf die Mikrosphärenverteilung entwickeln. Es ist denkbar, dass sich bei Untersuchungen der Myokardperfusion mit fluoreszierenden Mikrosphären im Rahmen von in- vivo Versuchsmodellen im weiteren postoperativen Verlauf Unterschiede zeigen würden. Bisher sind solche Untersuchungen noch nicht durchgeführt worden. Die Perfusionsdauer und die hämodynamische Leistung der hDAF- transgenen Schweineherzen konnte durch eine Zugabe von Tirofiban in das Perfusat nicht signifikant gesteigert werden.

Die hyperakute Abstoßungsreaktion ist charakterisiert durch eine Antikörper-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems. Durch GAS 914 konnten die Konzentrationen an Anti- Gal $\alpha$ (1-3)- Gal IgG- und IgM- Antikörper signifikant reduziert werden. Die Konzentration der Anti- Schwein hämolytischen Antikörpern wird ebenfalls signifikant durch GAS 914 reduziert. Dies zeigt, dass diese zu Beginn der HAR überwiegend eine Gal $\alpha$ (1-3)- Gal Spezifität aufweisen.

Die Steigerung der Perfusionsdauer und der Herzfunktion durch die Gabe von GAS 914 ist ein Beleg für die große Bedeutung der humoralen Immunreaktion bei HAR. Der Effekt von GAS 914 zeigt auch, dass die hDAF- Transgenität alleine nicht ausreicht, um die HAR vollständig zu unterdrücken, da zum einen durch hDAF das Komplementsystem vermutlich nicht vollständig blockiert werden kann, zum anderen die Effekte der Antikörperreaktion auf z.B. das Gerinnungssystem und die

Endothelzellaktivierung nicht beeinflusst werden können. Ein dadurch entstehender möglicher Effekt auf die Mikrosphärenverteilung ist vermutlich erst zu einem späteren Zeitpunkt messbar. Der geringere Verbrauch von Fibrinogen durch die Gabe von GAS 914 könnte ein Hinweis auf einen erst später darstellbaren Effekt durch die Bindung der präformierten zytotoxischen Antikörper auf die Mikro- und Makrozirkulation darstellen. Eine positive Beeinflussung der HAR durch GAS 914 im in- vivo Modell konnte anhand von, im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführten, orthotopen Transplantationen von hDAF- transgenen Schweineherzen in Paviane nachgewiesen werden.

## 6. Vorträge und Publikationen

### 6.1 Originalpublikationen

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Jöckle H, Brenner P, Burdorf L, Bauer A, Baschnegger H, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Hammer C, Thein E, Reichart B, Schmoeckel M.

Prolonged survival after preclinical orthotopic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation using a moderate immunosuppression.

Xenotransplantation: submitted

Brandl U, Jöckle H, **Erhardt M**, Michel S, Burdorf L, Brenner P, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Hammer C, Thein E, Reichart B, Schmoeckel M.

Reduced fibrin deposition and intravascular thrombosis in hDAF transgenic pig hearts perfused with tirofiban.

Transplantation: 2007 Dec; 84(12): 1667-76

Brandl U, **Erhardt M**, Michel S, Jöckle H, Burdorf L, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Brenner P, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M.

Soluble Gal $\alpha$ (1,3)Gal conjugate combined with hDAF preserves morphology and improves function of cardiac xenografts.

Xenotransplantation 2007 Jul; 14(4): 323 - 332

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Brenner P, Burdorf L, Jöckle H, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M.

Transgenic animals in experimental xenotransplantation models: orthotopic heart transplantation in the pig-to-baboon model.

Transplant Proc 2007 Mar; 39(2): 577 - 578

Brandl U, **Erhardt M**, Jöckle H, Michel S, Thein E, Bittmann I, Brenner P, Burdorf L, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M.

Fluorescent microspheres reveal different regional blood flow in hyperacutely rejected nontransgenic and hDAF pig hearts.

Transplant Proc 2006 Apr; 38(3): 733 - 734

Brandl U, **Erhardt M**, Jöckle H, Michel S, Brenner P, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Combining the hDAF transgene with the GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban improves hearts performance and reduces myocardial damage following hyperacute rejection in an ex vivo perfusion model.

Transplant Proc 2005 Jan-Feb; 37(1): 491 - 492

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Brenner P, Burdorf L, Bittmann I, Rößle M, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Administration of GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart transplantation model.

Xenotransplantation 2005 Mar; 12(2): 134 – 141

## 6.2 Abstracts

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Brenner P, Burdorf L, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M.  
Orthotopic Heart Transplantations in the Pig-to-Baboon Model.  
Xenotransplantation 2007 Sep; in press

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Brenner P, Burdorf L, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M.  
Transgenic Animals in Experimental Xenotransplantation Models: Orthotopic Heart Transplantations in the Pig-to-Baboon Model.  
9th Minisymposium Xenotransplantation Joint Meeting of the German Working Group Xenotransplantation (DAX) and the German DFG-Transregional Research group *Xenotransplantation*, Berlin, 8. - 9. Juni 2006; Book of Abstracts

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Brenner P, Burdorf L, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M.  
Transgene Tiere in experimentellen Xenotransplantationsmodellen: Orthotope Herztransplantation im Schwein-auf-Pavian Modell.  
TxMed 2006; Supple II

Brandl U, **Erhardt M**, Michel S, Thein E, Jöckle H, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.  
Fluorescent microspheres reveal different regional blood flow in non-transgenic and hDAF pig hearts perfused with human blood and GAS914 or tirofiban.  
Xenotransplantation 2005 Sep; 12(5): 416



Brandl U, **Erhardt M**, Michel S, Thein E, Bittmann I, Rößle M, Jöckle H, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Fluorescent microspheres reveal different regional blood flow in hypereacutely rejected non-transgenic and hDAF pig hearts.

TxMed 2005; Supple II

Brandl U, **Erhardt M**, Michel S, Thein E, Jöckle H, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Assessment of changes of regional in hyperacutely rejected hDAF transgenic and non-transgenic pig hearts by means of fluorescent microspheres.

Thorac and Cardiovasc Surg 2005; 53 (S 1)

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Jöckle H, Brenner P, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Effective and persistent depletion of both anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal IgM and IgG antibodies by GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart.

Thorac and Cardiovasc Surg 2005; 53 (S 1)

Brandl U, **Erhardt M**, Jöckle H, Michel S, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Effects of GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban in combination with the hDAF transgene on transplant survival in an ex-vivo pig heart perfusion model.

2. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI) am 26./27.03.2004 in Berlin; Charite-Universitätsmedizin Berlin: Book of Abstracts

Brandl U, **Erhardt M**, Jöckle H, Michel S, Bittmann I, Rößle M, Mordstein V, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Combining the hDAF transgene with the GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban improves myocardial damage following hyperacute rejection in an ex-vivo perfusion model. Transplantation 2004 Jul 27; 78(2) Suppl 1: 573-574

Brandl U, **Erhardt M**, Michel S, Rößle M, Bittmann I, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Influence of tirofiban on hyperacute rejection of hDAF pig hearts perfused with human blood in a working heart model.

Xenotransplantation 2003 Sep; 10(5): 488

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Brenner S, Baschnegger H, Bauer A, Bittmann I, Rößle M, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Prolonged survival of baboons after orthotopic xenotransplantation of hDAF transgenic pig hearts using a moderate immunosuppression.

Xenotransplantation 2003 Sep; 10(5): 489

Brandl U, **Erhardt M**, Michel S, Rößle M, Bittmann I, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

GAS914 tested on hDAF-pig hearts perfused with human blood in a working heart model.

Xenotransplantation 2003 Sep; 10(5): 513

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Brenner S, Baschnegger H, Bauer A, Bittmann I, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

25 days survival of baboon after orthotopic xenotransplantation of hDAF transgenic pig hearts using a moderate immunosuppression.

J Heart Lung Transplant 2003 Jan ; 22(1 S1): S100-S101

Brandl U, Michel S, **Erhardt M**, Brenner S, Baschnegger H, Bauer A, Bittmann I, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Prolonged survival of baboons treated with a moderate immunosuppression after orthotopic xenotransplantation of hDAF-transgenic pig hearts.

Thorac Cardiovasc Surg 2003; 51(S 1): 45

Brandl U, **Erhardt M**, Michel S, Rößle M, Bittmann I, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.

Influence of GAS914 and tirofiban on hyperacute rejection of hDAF pig hearts in an ex-vivo perfusion model with human blood.

Thorac Cardiovasc Surg 2003; 51(S 1): 46

### 6.3 Vorträge

- Juli 2002                      Untersuchung von Veränderungen der Mikrozirkulation in mit Humanblut perfundierten Schweinherzen durch eine hyperakute Abstoßungsreaktion, sowie deren Beeinflussung durch den humanen Komplementregulator hDAF, den GPIIb/IIIa-Inhibitor Tirofiban und das lösliche  $\alpha$ Gal-Oligosaccharid GAS914 mittels fluoreszierender Mikrosphären  
Institut für Chirurgische Forschung der LMU München
- März 2003                      Xenoperfusion of Transgenic Pig Hearts with Human Blood  
5th Workshop of Xenotransplantation; Spitzingsee, Deutschland

## 7. Literatur

- Akbulut M, Ozbay Y, Gundogdu O, Dagli N, Durukan P, Ilkay E, Arslan N:  
Effects of tirofiban on acute systemic inflammatory response in elective  
percutaneous coronary interventions.  
Curr Med Res Opin. 2004 Nov;20(11):1759-67.
- Allan JS, Broussard SR, Michaels MG, Starzl TE, Leighton KL, Whitehead EM,  
Comuzzie AG, Lanford RE, Leland MM, Switzer WM, Heneine W.:  
Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon  
liver transplants.  
AIDS Res Hum Retroviruses. 1998 Jul 1;14(10):821-4.
- Allan JS:  
The risk of using baboons as transplant donors. Exogenous and endogenous  
viruses.  
Ann N Y Acad Sci. 1998 Dec 30; 862:87-99.
- Allan JS:  
Understanding xenotransplantation risks from nonhuman primate retroviruses.  
Curr Top Microbiol Immunol. 2003; 278:101-23.
- Alwayn IP, Appel JZ, Goepfert C, Buhler L, Cooper DK, Robson SC:  
Inhibition of platelet aggregation in baboons: therapeutic implications for  
xenotransplantation.  
Xenotransplantation. 2000 Nov; 7(4):247-57.

- Appel JZ 3rd, Alwayn IP, Buhler L, DeAngelis HA, Robson SC, Cooper DK:  
Modulation of platelet aggregation in baboons: implications for mixed  
chimerism in xenotransplantation. I. The roles of individual components of a  
transplantation conditioning regimen and of pig peripheral blood progenitor  
cells.  
Transplantation. 2001 Oct 15; 72(7):1299-305.
- Atkinson JP, Oglesby TJ, White D, Adams EA, Liszewski MK:  
Separation of self from non-self in the complement system: a role for  
membrane cofactor protein and decay accelerating factor.  
Clin Exp Immunol. 1991 Oct; 86 Suppl 1:27-30.
- Auchincloss H:  
Why is cell- mediated xenograft rejection so strong?  
Xeno 1995, 3:19-22
- Bach FH, Ferran C, Soares M, Wrighton CJ, Anrather J, Winkler H, Robson  
SC, Hancock WW:  
Modification of vascular responses in xenotransplantation: inflammation and  
apoptosis.  
Nat Med. 1997 Sep; 3(9):944-8.
- Bach FH, Robson SC, Ferran C, Winkler H, Millan MT, Stuhlmeier KM,  
Vanhove B, Blakely ML, van der Werf WJ, Hofer E, et al.:  
Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection.  
Immunol Rev. 1994 Oct; 141:5-30.
- Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW, Robson SC:  
Delayed xenograft rejection.  
Immunology today 1996, 17: 379-384

- Baldwin WM 3rd, Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F.:  
Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury,  
and rejection.  
Transplantation. 1995 Mar 27;59 (6):797-808.
- Barnard CN et al:  
Heterothopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of left  
heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass.  
S Afr Med J 1977, 52: 1035- 1038
- Barnard et al.:  
A human cardiac transplant: An interim report of a successful operation  
performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town.  
S Afr Med J 1967, 41:1271- 1274
- Bertram U, Moser M, Peter K, Kuecherer HF, Bekeredjian R, Straub A, Nordt  
TK, Bode C, Ruef J:  
Effects of different thrombolytic treatment regimen with abciximab and tirofiban  
on platelet aggregation and platelet-leukocyte interactions: a subgroup  
analysis from the GUSTO V and FASTER trials.  
J Thromb Thrombolysis. 2002 Dec;14 (3):197-203.
- Bhatti FN, Schmoeckel M, Zaidi A, Cozzi E, Chavez G, Goddard M, Dunning  
JJ, Wallwork J, White DJ:  
Three-month survival of HDAFF transgenic pig hearts transplanted into  
primates.  
Transplant Proc. 1999 Feb-Mar;31 (1-2):958.
- Bonz AW, Lengenfelder B, Jacobs M, Strotmann J, Held S, Ertl G, Voelker W:  
Cytokine response after percutaneous coronary intervention in stable angina:

effect of selective glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonism.

Am Heart J. 2003 Apr;145 (4):693-9.

- Brandl U, Michel S, Erhardt M, Brenner P, Bittmann I, Rossle M, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.:  
Administration of GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart transplantation model. Xenotransplantation. 2005 Mar;12(2):134-41
- Brandl U, Michel S, Erhardt M, Brenner P, Burdorf L, Jockle H, Bittmann I, Rossle M, Mordstein V, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M.:  
Transgenic Animals in Experimental Xenotransplantation Models: Orthotopic Heart Transplantation in the Pig-to-Baboon Model.  
Transplant Proc. 2007 Mar;39 (2):577-8.
- Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Meiser B, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B:  
Prevention of hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons using immunoabsorption of antibodies and complement factors.  
Transpl Int. 2000; 13 Suppl 1:S508-17.
- Brenner P, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Uchita S, Brandl U, Hinz M, Felbinger T, Meiser B, Hammer C, Reichenspurner H, Reichart B:  
Combination of hDAF-transgenic pig hearts and immunoabsorption in heterotopic xenotransplantation of immunosuppressed baboons.  
Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37 (1):483-6.
- Bühler L, Basker M, Alwayn IPJ, Goepfert C, Kitamura H, Kawai T, Gojo S, Kozlowski Z, Ierino FL, Awwad M, Sachs DH, Sackstein R, Robson SC, Cooper DKG:



Coagulation and thrombotic disorders associated with pig organ and hemapoetic cell transplantation in nonhuman primates.

Transplantation 2000 Nov; 70(9): 1323- 1331

- Buhler L, Yamada K, Kitamura H, Alwayn IP, Basker M, Appel JZ 3rd, Colvin RB, White-Scharf ME, Sachs DH, Robson SC, Awwad M, Cooper DK:  
Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal(alpha)1-3Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation.

Transplantation. 2001 Dec 15;72 (11):1743-52.

- Bussemaker J, Groeneveld AB, Teerlink T, Hennekes M, Westerhof N, van Beek JH:

Low- and high-blood flow regions in the normal pig heart are equally vulnerable to ischaemia during partial coronary stenosis.

Pflugers Arch. 1997 Nov; 434 (6):785-94.

- Byrne GW, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SM, Platt JL, Logan JS:  
Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage.

Transplantation. 1997 Jan 15; 63 (1):149-55.

- Byrne GW, Schirmer JM, Fass DN, Teotia SS, Kremers WK, Xu H, Naziruddin B, Tazelaar HD, Logan JS, McGregor CG:

Warfarin or low-molecular-weight heparin therapy does not prolong pig-to-primate cardiac xenograft function.

Am J Transplant. 2005 May; 5(5):1011-20.

- Candinas D, Belliveau S, Koyamada N, Miyatake T, Hechenleitner P, Mark W, Bach FH, Hancock WW:

T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine

production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection.

Transplantation. 1996 Dec 27; 62(12):1920-7.

- Candinas D, Lesnikoski BA, Hancock WW, Otsu I, Koyamada N, Dalmaso AP, Robson SC, Bach FH:  
Inhibition of platelet integrin GPIIb/IIIa prolongs survival of discordant cardiac xenografts.  
Transplantation. 1996 Jul 15; 62(1):1-5.
- Fecke W, Long J, Richards A, Harrison R.:  
Protection of hDAF-transgenic porcine endothelial cells against activation by human complement: role of the membrane attack complex.  
Xenotransplantation. 2002 Mar; 9(2):97-105. 5.
- Caron A, Theoret JF, Mousa SA, Merhi Y:  
Anti-platelet effects of GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils.  
J Cardiovasc Pharmacol. 2002 Aug; 40(2):296-306.
- Carrel A :  
La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères.  
Lyon Med. 1902 ; 98 :858
- Carrington CA, dos Santos Cruz G.:  
Effect of cell surface concentration of human DAF on transgenic pig aortic endothelial cells on the degree of protection afforded against human complement deposition.  
Xenotransplantation. 2001 May; 8(2):100-5.

- Cattell V, Jamieson SW:  
Hyperacute rejection of guinea pig to rat cardiac xenografts.  
J Pathol 1975; 115-:183
- Chaussy C, Hammer C, von Scheel J, Pielsticker K, Sollinger HW, Pfeifer KJ, Pongratz H, Brendel W:  
Xenogeneic skin and kidney transplants in a closely related canine system, fox-dog. Transplantation. 1975 Aug; 20(2):150-4.
- Chavez-Peon F, Monchik G, Winn HJ, Russell PS.:  
Humoral factors in experimental renal allograft and xenograft rejection.  
Transplant Proc. 1971 Mar; 3(1):573-6
- Chen G, Sun H, Yang H, Kubelik D, Garcia B, Luo Y, Xiang Y, Qian A, Copeman L, Liu W, Cardella CJ, Wang W, Xiong Y, Wall W, White DJ, Zhong R:  
The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy.  
Transplantation. 2006 Jan 27; 81(2):273-83.
- Chien GL, Anselone CG, Davis RF, Van Winkle DM:  
Fluorescent vs. radioactive microsphere measurement of regional myocardial blood flow.  
Cardiovasc Res. 1995 Sep; 30(3):405-12.
- Colonna P, Cadeddu C, Montisci R, Chen L, Meloni L, Iliceto S:  
Transmural heterogeneity of myocardial contraction and ischemia. Diagnosis and clinical implications.

- Cooper DK, Good AH, Koren E, Oriol R, Malcolm AJ, Ippolito RM, Neethling FA, Ye Y, Romano E, Zuhdi N:  
Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man.  
Transpl Immunol. 1993; 1(3):198-205.
- Cooper DKG, Kemp E, Reemtsma K, White DJG  
Experimental xenotransplantation between sistantly related nonprimate species.  
Xenotransplantation (1st edition). Heidelberg: Springer, 1991;231
- Cooper DK:  
Depletion of natural antibodies in non-human primates--a step towards successful discordant xenografting in humans.  
Clin Transplant. 1992 Jun; 6(3 part 1):178-83.
- Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, Brown AA, Chen CG, Fisicaro N, Francis DM, Goodman DJ, Han W, Kurek M, Nottle MB, Pearse MJ, Salvaris E, Shinkel TA, Stainsby GV, Stewart AB, d'Apice AJ:  
Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons.  
Transplantation. 2000 Jun 27;69(12):2504-15
- Cozzi E, Simioni P, Boldrin M, Seveso M, Calabrese F, Baldan N, Castagnaro M, Gavasso S, Fadin M, Zerbinati P, Tormene D, Tognin G, Thiene G, Pagnan A, Ancona E:  
Alterations in the coagulation profile in renal pig-to-monkey xenotransplantation.  
Am J Transplant. 2004 Mar; 4(3):335-45.

- Cozzi E, White DJ  
The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans.  
Nat Med. 1995 Sep; 1(9):964-6. Review.
- Czaplicki et al:  
The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human.  
J Heart Lung transplant 1992, 11: 393. 396
- Daar AS:  
Ethics of xenotransplantation: animal issues, consent, and likely  
transformation of transplant ethics.  
World J Surg. 1997 Nov-Dec; 21(9):975-82.
- Dalmaso AP, Platt JL:  
Prevention of complement-mediated activation of xenogeneic endothelial cells  
in an in vitro model of xenograft hyperacute rejection by C1 inhibitor.  
Transplantation. 1993 Nov; 56(5):1171-6.
- Dalmaso AP:  
The complement system in xenotransplantation.  
Immunopharmacology. 1992 Sep-Oct; 24(2):149-60.
- Daniels LJ, Platt JL:  
Hyperacute xenograft rejection as an immunologic barrier to  
xenotransplantation.  
Kidney Int Suppl. 1997 Mar; 58:S28-35.
- Dehoux JP, Hori S, Talpe S, Bazin H, Latinne D, Soares MP, Gianello P:  
Specific depletion of preformed IgM natural antibodies by administration of  
anti-mu monoclonal antibody suppresses hyperacute rejection of pig to  
baboon renal xenografts.  
Transplantation. 2000 Sep 27;70(6):935-46

- Digerness SB, Kirklin JW, Naftel DC, Blackstone EH, Kirklin JK, Samuelson PN:  
Coronary and systemic vascular resistance during reperfusion after global myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg.* 1988 Oct;46(4):447-54.
- Dunning JJ, Pierson RN 3rd, Braidley PC, White DJ, Wallwork J. A:  
comparison of the performance of pig hearts perfused with pig or human blood using an ex-vivo working heart model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994; 8(4):204-6.
- Fiane AE, Videm V, Mollnes TE, Hogasen K, Hovig T:  
Inhibition of platelet aggregation by the GPIIb/IIIa antagonist reopro does not significantly prolong xenograft survival in an ex vivo model.  
*Transpl Int.* 1999; 12(5):323-33.
- Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, Rollins SA, Knight JW, Velander W, Squinto SP:  
Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 8; 91(23):11153-7.
- Forty J, Hasan R, Cary N, White DJ, Wallwork J:  
Hyperacute rejection of rabbit hearts by human blood is mediated by the alternative pathway of complement.  
*Transplant Proc.* 1992 Apr; 24(2):488-9.
- Forty J, Hasan R, Cary N, White DJ, Wallwork J:  
Perfusion of rabbit hearts with human blood results in immediate graft thrombosis, a temporally distinct component of hyperacute rejection.  
*Transpl Int.* 1992; 5 Suppl 1:S305-6.

- Forty J, White DG, Wallwork J:  
A technique for perfusion of an isolated working heart to investigate hyperacute discordant xenograft rejection.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 1993 Aug; 106(2):308-16.
- Forty J, White DJ, Wallwork J:  
Activation of the alternative pathway of complement in hyperacute xenograft rejection of rabbit hearts by human blood.  
J Heart Lung Transplant. 1993 Mar-Apr; 12(2):283-6; discussion 286-7.
- Gaca JG, Leshner A, Aksoy O, Gonzales- Stawinski G, Platt JL, Lawson JH, Parker W, Davis RD:  
Disseminated intravascular coagulation in association with the pig- to- primate pulmonary xenotransplantation.  
Transplantation 2002 June; 73(11): 1717- 1723
- Galbusera M, Buelli S, Gastoldi S, Macconi D, Angioletti S, Testa C, Remuzzi G, Morigi M:  
Activation of porcine endothelium in response to xenogeneic serum causes thrombosis independently of platelet activation.  
Xenotransplantation. 2005 Mar; 12(2):110-20.
- Galili U, Buehler J, Shohet SB, Macher BA:  
The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies.  
J Exp Med. 1987 Mar 1; 165(3):693-704.

- Galili U, Matta KI:  
Inhibition of anti- Gal IgG binding porcine endothelial cells by synthetic oligosaccharides.  
Transplantation 1996; 62(2): 256-62
- Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA:  
Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells.  
J Biol Chem. 1988 Nov 25; 263(33):17755-62.
- Galili Um, Chen Z, Tanemura M, Seregina T, Link CJ: Understanding the induced antibody response.  
Graft 4 ( 2001 ), pp. 32-35
- Gibson T, Medawar PB:  
The fate of skin homografts in man.  
J. Anat. 1943, 77: 299- 310
- Glenny RW, Bernard S, Brinkley M:  
Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion:  
J Appl Physiol. 1993 May;74(5):2585-97.
- Goddard MJ, Dunning J, Horsley J, Atkinson C, Pino-Chavez G, Wallwork J:  
Histopathology of cardiac xenograft rejection in the pig-to-baboon model.  
J Heart Lung Transplant. 2002 Apr;21(4):474-84.
- Gonzalez-Stawinski GV, Daggett CW, Lau CL, Karoor S, Love SD, Logan JS, Gaca JG, Parker W, Davis RD Jr:  
Non-anti-Gal alpha1-3Gal antibody mechanisms are sufficient to cause hyperacute lung dysfunction in pulmonary xenotransplantation.  
J Am Coll Surg. 2002 Jun; 194(6):765-73.



- Hale SL, Alker KJ, Kloner RA:  
Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs.  
Circulation. 1988 Aug; 78(2):428-34.
- Hammer C, Chaussy C, Brendel W:  
Preformed natural antibodies in animals and man. Outlook on xenotransplantation.  
Eur Surg Res. 1973; 5(2):162-6.
- Hammer C, Chaussy C, von Scheel J, Pongratz H, Roscher E, Brendel W:  
Survival times of skin and kidney grafts within different canine species in relation to their genetic markers.  
Transplant Proc. 1975 Sep;7(3):439-47
- Hammer C, Linke R, Wagner F, Diefenbeck M.:  
Organs from animals for man.  
Int Arch Allergy Immunol. 1998 May; 116(1):5-21. Review.
- Hammer C, Molloy B:  
Ethical aspects in xenotransplantation.  
Transplant Proc. 1993 Aug; 25(4 Suppl 3):38-40.
- Hammer C:  
Physiological obstacles after xenotransplantation.  
Ann N Y Acad Sci. 1998 Dec 30; 862:19-27.
- Hammer C, Thein E:  
Physiological aspects of xenotransplantation,  
Xenotransplantation. 2002 Sep; 9(5):303-5.

- Hammer C:  
Preformed natural Antibodies (PNAB) and possibilities of modulation of hyperacute xenogeneic rejection ( HXAR ).  
Transplant Proc 1989; 21: 522-3
- Hardy JC et al:  
Heart transplantation in man: development studies and report of a case.  
JAMA 1964, 188: 1132- 1140
- Hoffman JI:  
Determinants and prediction of transmural myocardial perfusion  
Circulation. 1978 Sep; 58(3 Pt 1):381-91
- Houser SL, Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJ, Gollackner B, Cheng J, Shimizu A, Schuurman HJ, Cooper DK:  
Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. Xenotransplantation. 2004 Sep;11(5):416-25
- Huang J, Rebello SS, Faul JD, Lucchesi BR:  
Correlation between the in vivo efficacy of GPIIb/IIIa receptor antagonists (m7E3, MK-383 and DMP-728) and ex vivo platelet inhibition.  
Pharmacology. 1999 May; 58(5):252-64.
- Ierino FL, Kozlowski T, Siegel JB:  
Disseminated intravascular coagulation in association with the delayed rejection of pig to baboon xenografts.  
Transplantation 1998; 66: 1439
- Ikeda K, Nagasawa K, Horiuchi T, Tsuru T, Nishizaka H, Niho Y:  
C5a induces tissue factor activity on endothelial cells.  
Thromb Haemost. 1997 Feb; 77(2): 394-8

- Inbal A, Loscalzo J:  
Glycocalicin binding to von Willebrand factor adsorbed onto collagen-coated or polystyrene surfaces.  
Thromb Res. 1989 Nov 1; 56(3):347-57.
- Ito H, Miyakoda G, Mori T:  
Cilostazol inhibits platelet-leukocyte interaction by suppression of platelet activation.  
Platelets. 2004 Aug; 15(5):293-301.
- Jaboulay M:  
Grefe du reins au pli du coude par soudures arterielles et veineuses.  
Lyon Med. 1906 ; 107 : 575
- Jensen JA, Davies D, Linn BS, Snyderman R, Franklin L:  
Complement-mediated vasoconstriction and graft rejection.  
Circ Res. 1972 Mar; 30(3):332-40.
- Jurd KM, Gibbs RV, Hunt BJ:  
Activation of human prothrombin by porcine endothelium.  
Transplant Proc. 1996 Apr; 28(2):610. No abstract available.
- Kaplon RJ, Michler RE, Xu H, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Platt JL:  
Absence of hyperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts.  
Transplantation. 1995 Jan 15; 59(1):1-6.
- Kaplon RJ, Platt JL, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Xu H, Shah AS, Masroor S, Michler RE:  
Absence of hyperacute rejection in pig-to-primate orthotopic pulmonary xenografts.  
Transplantation. 1995 Feb 15; 59(3):410-6.

- Katopodis AG, Warner RG, Duthaler RO, Streiff MB, Bruelisauer A, Kretz O, Dorobek B, Persohn E, Andres H, Schweitzer A, Thoma G, Kinzy W, Quesniaux VF, Cozzi E, Davies HF, Manez R, White D:  
Removal of anti-Gal $\alpha$ 1,3Gal xenoantibodies with an injectable polymer.  
J Clin Invest. 2002 Dec; 110(12):1869-77.
- King BO, Whittow ES, Serna DL, Jones BU, Eng JS, Chen JC:  
Tirofiban administration attenuates platelet and platelet-neutrophil conjugation but not neutrophil degranulation during in vitro VAD circulation.  
ASAIO J. 2001 May-Jun; 47(3):282-7.
- Kirklin JK, Neves J, Naftel DC, Digerness SB, Kirklin JW, Blackstone EH:  
Controlled initial hyperkalemic reperfusion after cardiac transplantation: coronary vascular resistance and blood flow.  
Ann Thorac Surg. 1990 Apr;49(4):625-31
- Kissmeyer- Nielsen F, Olsen S, Peterson VP, Fjeldborg O:  
Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells.  
Lancet 2 1966 662-665
- Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, Rose AG, Hancock WW, Ye Y, Niekrasz M, Kosanke S, Wright LJ, White DJ, Cooper DK:  
Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy.  
Transplantation. 1997 Nov 15; 64(9):1255-61.

- Kopp CW, Siegel JB, Hancock WW, Anrather J, Winkler H, Geczy CL, Kaczmarek E, Bach FH, Robson SC:  
Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors.  
Transplantation. 1997 Mar 15; 63(5):749-58.
- Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Paffhausen W, Gross R, Heusch G:  
Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres.  
Circulation. 1991 Mar; 83(3):974-82.
- Kroshus TJ, Bolman RM 3rd, Dalmaso AP:  
Selective IgM depletion prolongs organ survival in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation.  
Transplantation. 1996 Jul 15; 62(1):5-12.
- Kwiatkowski P, Artrip JH, Michler RE, Wang SF, McKenzie IFC, Sandrin MS, Itescu S:  
Human monocytes bind to ligands on porcine endothelium containing the Gal $\alpha$ (1-3)-Gal antigen.  
Transplantation proc. 2000 Aug; 32(5): 93
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS:  
Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning.  
Science. 2002 Feb 8; 295(5557):1089-92.

- Lam TT, Paniagua R, Shivaram G, Schuurman HJ, Borie DC, Morris RE:  
Anti-non-Gal porcine endothelial cell antibodies in acute humoral xenograft rejection of hDAF-transgenic porcine hearts in cynomolgus monkeys.  
Xenotransplantation. 2004 Nov; 11(6):531-5.
- Land W, Schilling A, Aldenhoff J, Lamerz R, Pielsticker K, Mendler N, Brendel W:  
In vitro studies on the mechanism of hyperacute xenograft rejection.  
Transplant Proc. 1971 Mar; 3(1):888-90.
- Lawson JH, Daniels LJ, Platt JL:  
The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation.  
Transplant Proc. 1997 Feb-Mar; 29(1-2):884-5.
- Lawson JH, Platt JL:  
Molecular barriers to xenotransplantation.  
Transplantation. 1996 Aug 15; 62(3):303-10.
- Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman RM 3rd, Matas AJ:  
Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement.  
Transplantation. 1993 Apr; 55(4):857-65; discussion 865-6.
- Leventhal JR, John R, Fryer JP, Witson JC, Derlich JM, Remiszewski J, Dalmaso AP, Matas AJ, Bolman RM 3rd:  
Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. Results of in vitro and in vivo studies.  
Transplantation. 1995 Jan 27; 59(2):294-300.

- Levi M, Ten CH:  
Disseminated intravascular coagulation.  
N Engl J Med 1999 Aug; 341(8): 586- 92
- Li DS, Yong AC, Kilpatrick D:  
Validation of a subendocardial ischaemic sheep model by intracoronary  
fluorescent microspheres.  
Clin Exp Pharmacol Physiol. 1996 Feb; 23 (2):111-8.
- Li DS, Yong AC, Kilpatrick D:  
Validation of a subendocardial ischaemic sheep model by intracoronary  
fluorescent microspheres.  
Clin Exp Pharmacol Physiol. 1996 Feb; 23(2):111-8.
- Lin SS, Hanaway MJ, Gonzalez-Stawinski GV, Lau CL, Parker W, Davis RD,  
Byrne GW, Diamond LE, Logan JS, Platt JL:  
The role of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and  
accommodation of xenografts. Transplantation. 2000 Dec 27; 70(12):1667-74.
- Lin SS, Kooyman DL, Daniels LJ, Daggett CW, Parker W, Lawson JH, Hoopes  
CW, Gullotto C, Li L, Birch P, Davis RD, Diamond LE, Logan JS, Platt JL:  
The role of natural anti-Gal  $\alpha$  1-3Gal antibodies in hyperacute rejection of  
pig-to-baboon cardiac xenotransplants.  
Transpl Immunol. 1997 Sep; 5(3):212-8.
- Lin SS, Weidner BC, Byrne GW, Diamond LE, Lawson JH, Hoopes CW,  
Daniels LJ, Daggett CW, Parker W, Harland RC, Davis RD, Bollinger RR,  
Logan JS, Platt JL:  
The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac  
transplants.  
J Clin Invest. 1998 Apr 15; 101(8):1745-56.

- Liu D, Kobayashi T, Onishi A, Furusawa T, Iwamoto M, Suzuki S, Miwa Y, Nagasaka T, Maruyama S, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A:  
Relation between human decay-accelerating factor (hDAF) expression in pig cells and inhibition of human serum anti-pig cytotoxicity: value of highly expressed hDAF for xenotransplantation.  
Xenotransplantation. 2007 Jan; 14(1):67-73.
- Luo Y, Levy G, Ding J, Qi J, Chakbrati S, Garcia BM, Phillips MJ, Kumar N, Friend P, Noble L, Macdonald J, Zhong R, Grant D:  
hDAF transgenic pig livers are protected from hyperacute rejection during ex vivo perfusion with human blood.  
Xenotransplantation. 2002 Jan; 9(1):36-44
- Macchiarini P, Oriol R, Azimzadeh A, de Montpreville V, Rieben R, Bovin N, Mazmanian M, Darteville P:  
Evidence of human non-alpha-galactosyl antibodies involved in the hyperacute rejection of pig lungs and their removal by pig organ perfusion.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 1998 Nov; 116(5):831-43.
- Magee JC, Bucuvalas JC, Farmer DG, Harmon WE, Hulbert-Shearon TE, Mendeloff EN:  
Pediatric transplantation.  
Am J Transplant. 2004; 4 Suppl 9:54-71.
- Magee JC, Collins BH, Harland RC, Lindman BJ, Bollinger RR, Frank MM, Platt JL:  
Immunoglobulin prevents complement-mediated hyperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation.  
J Clin Invest. 1995 Nov; 96(5):2404-12.



- Matter- Reissmann UB, Forte P, Schneider MK, Filgueira L, Groscurth P, Seebach JD:  
  
Xenogeneic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent and not inhibited by Bcl-2 overexpression.  
  
Xenotransplantation 2002 Sep; 9(5):325-37
- Mazzucato M, De Marco L, Pradella P, Masotti A, Pareti FI:  
  
Porcine von Willebrand factor binding to human platelet GPIb induces transmembrane calcium influx.  
  
Thromb Haemost. 1996 Apr;75(4):655-60.
- McCurry KR, Kooyman DL, Diamond LE, Byrne GW, Logan JS, Platt JL:  
  
Transgenic expression of human complement regulatory proteins in mice results in diminished complement deposition during organ xenoperfusion.  
  
Transplantation. 1995 Apr 27; 59(8):1177-82.
- Menasche P:  
  
The inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its impact on postoperative myocardial function.  
  
Curr Opin Cardiol. 1995 Nov; 10(6):597-604.
- Michaels MG, Jenkins FJ, St George K, Nalesnik MA, Starzl TE, Rinaldo CR Jr:  
  
Detection of infectious baboon cytomegalovirus after baboon-to-human liver xenotransplantation.  
  
J Virol. 2001 Mar; 75(6):2825-8.
- Michler RE, O'Hair DP, Xu H, Shah AS, Itescu S:  
  
Newborn baboon immunity: lessons in cross-species transplantation.  
  
Ann Thorac Surg. 1995 Dec; 60(6 Suppl):S582-4.

- Miller BE, Levy JH:  
The inflammatory response to cardiopulmonary bypass.  
J Cardiothorac Vasc Anesth. 1997 May; 11(3):355-66.
- Nakajima H, Fujiwara I, Mizuta N, Sakaguchi K, Yamagashi H:  
Analysis of granzyme B and caspases pathway in xenogeneic cytotoxicity.  
Transplantation proceedings 2000 Aug; 32(5): 932-34
- Nozawa S, Xing Px, Wu GD, Gochi E, Kearns- Jonker M, Swensson J, Starnes VA, Sandrin MS, McKenzie IF, Cramer DV:  
Characteristics of immunoglobulin gene usage of the xenoantibody binding to Gal $\alpha$ (1-3)- Gal target antigens in the gal knockout mouse.  
Transplantation 2001 Jul; 72(1): 147-55
- Onozuka N, Harada O, Kobayashi M, Suto T, Fukuda A, Sudo Y, Takaya S:  
Effect of prostacyclin and glycoprotein IIb/IIIa inhibitor on hyperacute rejection in a rabbit-to-dog lung xenotransplant model.  
Transplant Proc. 2003 Feb; 35(1):531-2.
- Osman N, McKenzie IFC, Ostenried K, Ioannou YA, Desnick RJ, Mauro SS:  
Combined transgenic expression of  $\alpha$ - galaktosidase and  $\alpha$ (1-2)- fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal $\alpha$ (1-3)- Gal.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997 Dec, 94: 14677-14682
- Palmetshofer A, Galili U, Dalmaso AP, Robson SC, Bach FH:  
Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type II activation.  
Transplantation. 1998 Apr 15; 65(7):971-8.
- Peerschke EIB, Reid KBM, Ghebrehiwet B:  
Platelet activation by C1q results in the induction of (alpha)IIb/(beta)3 integrins

(GPIIb/IIIa) and the expression of p-selectin and procoagulant activity.

J Ex Med 1993; 178:579

- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL:

Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs.

Science 2003 Jan 17; 299(5605):411-4.

- Pierson RN 3rd, Barr ML, McCullough KP, Egan T, Garrity E, Jessup M, Murray S:

Thoracic organ transplantation.

Am J Transplant. 2004; 4 Suppl 9:93-105.

- Pierson RN 3rd, Pino-Chavez G, Young VK, Kaspar-Konig W, White DJ, Wallwork J:

Expression of human decay accelerating factor may protect pig lung from hyperacute rejection by human blood.

J Heart Lung Transplant. 1997 Feb; 16(2):231-9.

- Platt JL, Bach FH:

The barrier to xenotransplantation.

Transplantation. 1991 Dec; 52(6):937-47.

- Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolmann RM, Bach FH:

Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine- to- primate model.

Transplantation 1991; 52:214-20

- Platt JL, Lindman BJ, Geller RL, Noreen HJ, Swanson JL, Dalmaso AP, Bach FH:  
The role of natural antibodies in the activation of xenogenic endothelial cells.  
Transplantation. 1991 Dec; 52(6):1037-43.
- Platt JL, Vercellotti GM, Lindmann BJ, Oegema TR, Bach FH, Dalmaso AP:  
Release of Heparan sulphate from endothelial cells. Implications for the  
pathogenesis of hyperacute rejection.  
J Exp Med 1990 Apr; 171(4): 1363- 8
- Platt JL:  
Xenotransplantation: recent progress and current perspectives.  
Curr Opin Immunol. 1996 Oct; 8(5):721-8.
- Prinzen FW, Glenny RW:  
Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow  
measurement:  
Cardiovasc Res. 1994 Oct; 28(10):1467-75.
- Pruitt SK, Bollinger RR, Collins BH, Marsh HC Jr, Levin JL, Rudolph AR,  
Baldwin WM 3rd, Sanfilippo F:  
Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor  
type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts.  
Transplantation. 1997 Mar 27; 63(6):900-2.
- Raab S, Thein E, Harris AG, Messmer K:  
A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method.  
Am J Physiol. 1999 May; 276(5 Pt 2):H1801-6.

- Rieben R, Seebach JD:  
Xenograft rejection: IgG1, complement and NK cells team up to activate and destroy the endothelium.  
Trends Immunol. 2005 Jan;26(1):2-5
- Robson SC, Kaczmarek E, Siegel JB, Candinas D, Koziak K, Millan M, Hancock WW, Bach FH:  
Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation.  
J Exp Med. 1997 Jan 6; 185(1):153-63.
- Robson SC, Young VK, Cook NS, Metternich R, Kasper-Konig W, Lesnikoski BA, Pierson RN 3rd, Hancock WW, Candinas D, White DJ, Bach FH:  
Thrombin inhibition in an ex vivo model of porcine heart xenograft hyperacute rejection.  
Transplantation. 1996 Mar 27; 61(6):862-8.
- Rollins SA, Evans MJ, Johnson KK, Elliot EA, Squinto SP, Matis LA, Rother RP:  
Molecular and functional analysis of porcine E- Selectine reveals a potential role in xenograft rejection.  
Biochem Biophys Res Commun 1994 Oct; 204(2): 763-71
- Romano E, Neethling FA, Nilsson K, Kosanke S, Shimizu A, Magnusson S, Svensson L, Samuelsson B, Cooper DK:  
Intravenous synthetic alphaGal saccharides delay hyperacute rejection following pig- to- baboon heart transplantation.  
Xenotransplantation 1999 Feb; 6(1): 36-42

- Rose AG, Cooper DK:  
A histopathologic grading system of hyperacute (humoral, antibody-mediated) cardiac xenograft and allograft rejection.  
J Heart Lung Transplant. 1996 Aug; 15(8):804-17.
- Rose AG, Cooper DKG:  
Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection.  
Xenotransplantation 2000;7: 31-41
- Rose AG:  
Understanding the pathogenesis and the pathology of hyperacute cardiac rejection.  
Cardiovascular Pathology Vol. 11 2002 ( May- June ); 171-176
- Saadi S, Holzknicht RA, Patte CP, Stern DM, Platt JL:  
Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. J Exp Med. 1995 Dec 1; 182(6):1807-14.
- Saethre M, Solvik UO, Haraldsen G, Fiane AE, Boretti E, Thorsby E, Platt JL, Mollnes TE:  
Human serum-induced porcine endothelial cell E-selectin expression is associated with IgG3 and IgM anti-Gal antibodies  
Xenotransplantation. 2002 Sep;9(5):350-8
- Sandrin MS, McKenzie IF:  
Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies.  
Immunol Rev. 1994 Oct; 141:169-90.

- Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IF:  
Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Dec 1; 90(23):11391-5.
- Schaapherder AF, Daha MR, te Bulte MT, van der Woude FJ, Gooszen HG:  
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against porcine endothelium induced by a majority of human sera.  
Transplantation. 1994 May 15; 57(9):1376-82.
- Schirmer JM, Fass DN, Byrne GW, Tazelaar HD, Logan JS, McGregor CG:  
Effective antiplatelet therapy does not prolong transgenic pig to baboon cardiac xenograft survival.  
Xenotransplantation 2004 Sep; 11(5):436-43.
- Schmoeckel JM:  
Xenotransplantation hDAF- transgener Schweineherzen: Untersuchungen ex-vivo und am Primatenmodell  
Papst Science publishers 1998
- Schmoeckel M, Bhatti FN, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth PD, Tolan MJ, Pino-Chavez G, Goddard M, Warner RG, Langford GA, Dunning JJ, Wallwork J, White DJ:  
Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model.  
Transplantation. 1998 Jun 27;65(12):1570-7. Erratum in: Transplantation 1998 Oct 15;66(7):943.

- Schmoeckel M, Nollert G, Shahmohammadi M, Muller-Hocker J, Young VK, Kasper-Konig W, White DJ, Hammer C, Reichart B:

Transgenic human decay accelerating factor makes normal pigs function as a concordant species.

J Heart Lung Transplant. 1997 Jul; 16(7):758-64.
- Schmoeckel M, Nollert G, Shahmohammadi M, Young VK, Chavez G, Kasper-Konig W, White DJ, Muller-Hocker J, Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Hammer C, Reichart B:

Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts.

Transplantation. 1996 Sep 27; 62(6):729-34.
- Schneider MK, Strasser M, Galili UO, Kocher M, Moser R, Seebach J:

Rolling adhesion of human NK cells to porcine endothelial cells mainly relies on CD49d- CD106 interactions.

Transplantation 2002 Mar; 73(5): 789-96
- Schulte am Esch J, Cruz MA, Siegel JB, Anrather J, Robson SC:

Activation of human platelets by the membrane expressed A1 domain of von Willebrand factor.

Blood, Vol. 90 No. 11 ( Dec 1), 1997: 4425-4437
- SebilleF, Guillet M, Brouard S, Gagne K, Petzold T, Blancho G, Vanhove B, Souillou JP:

T- cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti- donor antibody response.

Am J Transplant 2001 May; 1(1): 21- 8



- Sheikh S, Parhar R, Kwaasi A, Collison K, Yacoub M, Stern D, Al- Mohanna F:  
Alpha- Gal- independent dual recognition and activation of xenogeneic  
endothelial cells and human natural killer cells.  
Transplantation 2000 Sep 27; 70(6): 917-28
- Siegel JB, Grey ST, Lesnikoski BA, Kopp CW, Soares M, Schulte am Esch J  
2nd, Bach FH, Robson SC:  
Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin.  
Transplantation. 1997 Sep 27; 64(6):888-96.
- Simon AR, Templin C, Schroder C, Laaff G, Tessmann R, Winkler ME, Tacke  
S, Denner J, Lapin B, Chikobava M, Patience C, Steinhoff G, Agrba VZ,  
Haverich A, Martin U:  
Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in pig-to-  
baboon xenotransplantation with sustained depletion of anti-alphaGal  
antibodies.  
Transplantation. 2005 Apr 15; 79(7):777-82.
- Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ:  
Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane  
glycoprotein IIb-IIIa complex.  
J Biol Chem. 1991 Apr 25; 266(12):7345-52.
- Sims PJ, Wiedmer T:  
The response of human platelets to activated components of the complement  
system.  
Immunol Today. 1991 Sep; 12(9):338-42.

- Solvik UO, Haraldsen G, Fiane AE, Boretti E, Lambris JD, Fung M, Thorsby E, Molnes TE:  
Human serum- induced expression of E- selectin on porcine aortic endothelial cells in vitro is totally complement mediated.  
Transplantation 2001 Dec; 72(12):1967-73
- Starzl TE et al:  
The reversal of rejection in human renal homografts with the subsequent development of homograft tolerance.  
Surg. Gynecol Obstet 1963, 117: 385- 395
- Starzl TE, Fung J, Tzakis A, et al:  
Baboon- to- human liver transplantation.  
Lancet 1993; 341:65-71
- Stevens RB, Wang YL, Kaji H, Lloveras J, Dalmaso A, Bach FH, Rubinstein P, Sutherland DER, Platt JL:  
Administration of nonanticoagulant heparin inhibits the loss of glycosaminoglycans from xenogeneic cardiac grafts and prolongs graft survival.  
Transplant Proc 1993, 25: 283
- Suckfull M, Mudsam M, Pieske O, Enders G, Babic R, Hammer C:  
Immunohistological studies of complement activation after xenogeneic perfusion of a working heart model.  
Transpl Int. 1994 Aug; 7(5):324-8.
- Suckfull MM, Pieske O, Mudsam M, Babic R, Hammer C:  
The contribution of endothelial cells to hyperacute rejection in xenogeneic perfused working hearts.  
Transplantation. 1994 Jan; 57(2):262-7.

- Sun H, Chen G, Liu W, Kubelik D, Yang H, White DJ, Zhong R, Garcia B:  
The influence of baseline expression of human decay accelerating factor transgene on graft survival and acute humoral xenograft rejection.  
Transplantation. 2005 Nov 15; 80(9):1331-9.
- Switzer WM, Michler RE, Shanmugam V, Matthews A, Hussain AI, Wright A, Sandstrom P, Chapman LE, Weber C, Safley S, Denny RR, Navarro A, Evans V, -Norin AJ, Kwiatkowski P, Heneine W:  
Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs.  
Transplantation. 2001 Apr 15; 71(7):959-65.
- Takahagi Y, Fujimura T, Miyagawa S, Nagashima H, Shigehisa T, Shirakura R, Murakami H:  
Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III.  
Mol Reprod Dev. 2005 Jul; 71(3):331-8.
- Tanemura M, Chong AS, DiSesa VJ, Galili:  
Direct killing of xenograft cells by CD8+ T cells of discordant xenograft recipients.  
Transplantation 2002 Dec; 74(11): 1587-95
- Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, Katerelos M, Shinkel TA, Van Denderen BJ, Lonie AJ, Lyons I, Nottle MB, Cox T, Becker C, Peura AM, Wigley PL, Crawford RJ, Robins AJ, Pearse MJ, d'Apice AJ:  
The alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation.  
Transplantation 1996 Jan 15; 61(1):13-9.

- Tedesco F, Pausa M, Nardon E, Introna M, Mantovani A, Dobrina A:  
The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity.  
J Exp Med. 1997 May 5; 185(9):1619-27.
- Thein E, Raab S, Harris AG, Kleen M, Habler O, Meisner F, Messmer K:  
Comparison of regional blood flow values measured by radioactive and fluorescent microspheres.  
Eur Surg Res. 2002 May-Jun; 34(3):215-23.
- Thein E, Raab S, Harris AG, Messmer K:  
Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of blood flow.  
Comput Methods Programs Biomed. 2000 Jan;61 (1):11-21.
- Tusio PJ, Cramer DV, Yasunaga C, Cosenza CA, Wu GD, Makowka L:  
Removal of natural human xenoantibodies to pig vascular endothelium by perfusion of blood through pig kidneys and livers.  
Transplantation. 1993 Jun;55 (6):1375-8.
- Uchita S, Thein E, Huber H, Wimmer C, Kur F, Brenner P, Hammer C:  
Porcine heart xenograft function and hyperacute rejection: the role of thrombin inhibition.  
Transplant Proc. 2001 Feb-Mar; 33(1-2):729-31.
- Van Oosterhout MF, Willigers HM, Reneman RS, Prinzen FW:  
Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique.  
Am J Physiol. 1995 Aug; 269(2 Pt 2):H725-33.

- Wang MW, Johnston PS, Wright LJ, Lim SM, White DJ:  
Immunofluorescent localization of pig complement component 3, regardless of the presence or absence of detectable immunoglobulins, in hyperacutely rejected heart xenografts.  
Histochem J. 1992 Feb; 24(2):102-9.
- Waterworth PD, Dunning J, Tolan M, Cozzi E, Langford G, Chavez G, White D, Wallwork J:  
Life-supporting pig-to-baboon heart xenotransplantation.  
J Heart Lung Transplant. 1998 Dec; 17(12):1201-7.
- Watts A, Foley A, Awwad M, Treter S, Oravec G, Buhler L, Alwayn IP, Kozlowski T, Lambrigts D, Gojo S, Basker M, White-Scharf ME, Andrews D, Sachs DH, Cooper DK:  
Plasma perfusion by apheresis through a Gal immunoaffinity column successfully depletes anti-Gal antibody: experience with 320 aphereses in baboons.  
Xenotransplantation. 2000 Aug;7(3):181-5.
- Wight DGD:  
Histopathology of liver Xenograft rejection.  
Xenotransplantation( 1st edition ) Heidelberg: Springer, 1991; 253
- Winkler ME, Winkler M, Burian R, Hecker J, Loss M, Przemeck M, Lorenz R, Patience C, Karlas A, Sommer S, Denner J, Martin U.:Analysis of pig-to-human porcine endogenous retrovirus transmission in a triple-species kidney xenotransplantation model.  
Transpl Int. 2005 May; 17(12):848-58. Epub 2005 Apr 29.

- Xu H, Edwards N, Chen JM, Dong X, Michler RE:  
Age-related development of human anti-pig xenoantibody.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 1995 Oct;110(4 Pt 1):1023-9
- Xu H, Fagoaga O, Gundfy SR, Bailey L:  
The role of human anti- pig xenogeneic cellular responses.  
Transpl Proc 2000 Aug; 32(5): 952- 953
- Ye Y Neethling FA, Niekrasz M, Koren E, Richards SV, Martin M, Kosanke S, Oriol R, Cooper DK:  
Evidence that intravenously administered alpha-galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells ( PK 15 ) and transplanted pig hearts.  
Transplantation 1994 Aug; 58(3):330-337
- Zhong R, Luo Y, Yang H, Garcia B, Ghanekar A, Luke P, Chakrabarti S, Lajoie G, Phillips MJ, Katopodis AG, Duthaler RO, Cattral M, Wall W, Jevnikar A, Bailey M, Levy GA, Grant DR:  
Improvement in human decay accelerating factor transgenic porcine kidney xenograft rejection with intravenous administration of gas914, a polymeric form of alphaGAL.  
Transplantation. 2003 Jan 15;75 (1):10-9.
- Zhu:  
Binding of human natural antibodies to nonalphaGal xenoantigens on porcine erythrocytes.  
Transplantation. 2000 Jun 15; 69(11):2422-8.
- Zhu A, Hurst R:  
Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum.  
Xenotransplantation. 2002 Nov; 9(6):376-81.

## 8. Curriculum vitae

Name	Erhardt
Vorname	Matthias
Geboren	16.05.1977
Geburtsort	Heidelberg
1997:	Abitur am Helmholtz- Gymnasium Heidelberg nach Grundschule und Gymnasium
1997/ 1998	Zivildienst beim Rettungsdienst des Roten Kreuzes Heidelberg (Rettungshelfer)
1999- 2001	Studium der Humanmedizin an der Ruprecht- Karls- Universität Heidelberg
2001- 2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians- Universität München
2005	Approbation als Arzt
ab 1/2006	Assistenzarzt an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Ludwigshafen, Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie, Unfallchirurgische Klinik an der Universität Heidelberg, Ärztlicher Direktor: Univ. Prof. Dr. A. Wentzensen

## 9. Danksagung

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei folgenden Personen, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre, bedanken:

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bruno Reichart, Direktor der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig- Maximilians- Universität München, für die Vergabe des Dissertationsthemas und seine wissenschaftliche Unterstützung.

Ganz besonders bei Frau PD Dr. med. Ulrike Brandl- Selvåg, Herzchirurgische Klinik der Ludwig- Maximilians- Universität München, für ihre hervorragende, vorbildliche und unermüdliche Arbeit als Betreuerin. Ihre Hilfe, ihr Engagement und ihre einzigartige, allzeitige Unterstützung und Anleitung trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Herrn Prof. Dr. Konrad Meßmer, bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl und bei Herrn Prof. Dr. Alexander Baethmann dafür, dass ich am Institut für Chirurgischen Forschung der Ludwig- Maximilians- Universität meine Arbeit ausführen durfte.

Mein außerordentlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. C. Hammer, dem Pionier der deutschen Xenotransplantationsforschung, der durch seine große und vielseitige Erfahrung mir nicht nur auf wissenschaftlichem Gebiet immer ein Vorbild bleiben wird.

Bei Herrn Dr. Eckart Thein, der insbesondere bei den Mikrosphärenuntersuchungen jederzeit ein kompetenter und hilfsbereiter Ansprechpartner war.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Chirurgische Forschung, insbesondere bei Frau S. Münzing und Frau A.- M. Allmeling, für die logistische Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Bei Herrn Dipl. phys. Dr. rer. nat. Jürgen Peters für die außerordentlich gute Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Bei Frau Antje Uhlig, Herzchirurgische Klinik der Ludwig- Maximilians- Universität München, für die große Hilfe bei der Bestimmung der Antikörperspiegel und bei Herrn Dr. Peter Göring, Institut für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern, für die Hilfe bei der laborchemischen Auswertung der Proben.

Bei meinen beiden Mitdoktoranden Sebastian Michel und Hanna Jöckle für deren Hilfe und kollegiale, freundschaftliche Zusammenarbeit.